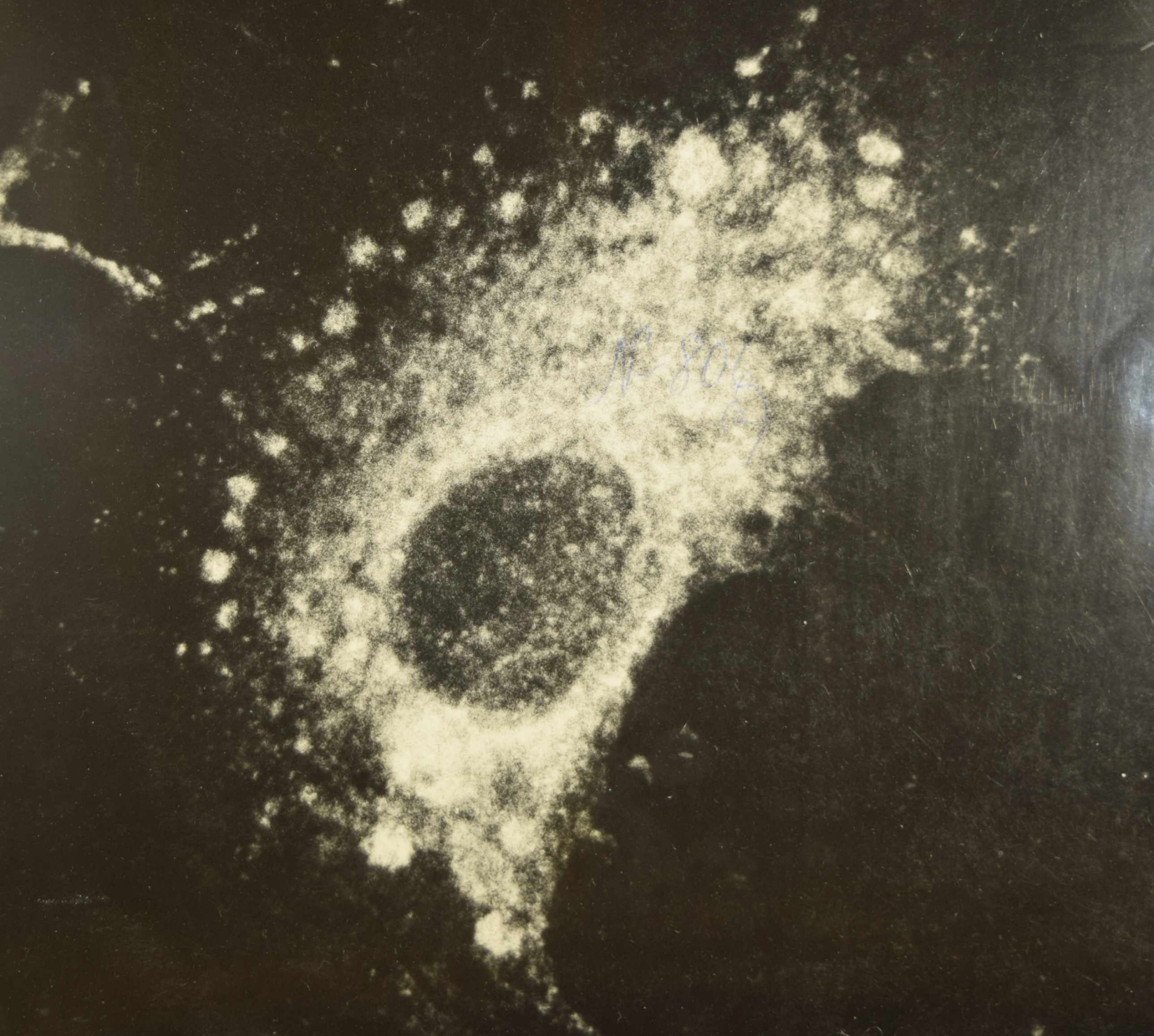


ARENAVIRUS: SU INTERACCION CON LA
CELULA HOSPEDADORA.

Ricardo A. López



Antígenos virales en células Vero infectadas con Virus Tacaribe

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Facultad de Ciencias Exactas

**ARENAVIRUS: SU INTERACCION
CON LA CELULA HOSPEDADORA.**

TESIS

para optar al grado de
Doctor en Ciencias Bioquímicas

AUTOR: RICARDO LOPEZ

DIRECTOR: Dra. M.T. FRANZE-FERNANDEZ

ASESOR CIENTIFICO: Dr. O. GRAU

INSTITUTO DE QUIMICA Y FISICOQUIMICA

BIOLOGICAS (UBA - CONICET)

1986

Nº 806 (2)

Don Autor

9-XII-77

72677

53119

A mi esposa

A mis hijos

A la memoria de mi padre

Agradecimientos

A la Dra. María Teresa Franze-Fernández por su importante contribución a mi formación científica y personal. Por su constante estímulo y calidad humana.

Al Dr. Oscar Grau por su permanente asesoramiento científico durante el desarrollo del presente trabajo.

Al Dr. Alejandro C. Paladini por haberme permitido realizar este trabajo en el Instituto que él dirige.

A las Dras. Sivia Iapalucci, Nora Perrone y Liliana Haim, al Bioquímico Horacio Salomón y a los Biólogos Marcelo Daelli y Osvaldo Rey por su permanente colaboración y amistad.

Indice general

ABREVIATURAS.	11
INTRODUCCION.	13
1. MIEMBROS DE LA FAMILIA DE ARENAVIRIDAE	14
2. CARACTERIZACION DE LOS VIRIONES AISLADOS	16
2.1. Morfología y propiedades físicas	16
2.2. Composición química.	17
2.2.1. Proteínas.	17
2.2.2. Acidos nucleicos	19
2.2.3. Lípidos.	20
3. REPLICACION DE LOS ARENAVIRUS EN CELULAS ANIMALES.	21
3.1. Rango de hospedadores.	21
3.2. Caracterización de las infecciones por arenavirus en cultivos celulares.	22
3.2.1. Ciclo de crecimiento viral	22
3.2.2. Partículas defectivas interferentes.	24
3.2.3. Establecimiento de infecciones persistentes.	29
3.2.4. Efecto citopático.	31
3.2.5. Efecto de la replicación viral sobre la síntesis de macromoléculas celulares	32
3.3. Síntesis de proteínas y ARNs virales en las células infectadas	34
3.3.1. Síntesis de proteínas virales intracelulares	34
3.3.2. Replicación del ARN viral.	36
3.4. Requerimiento de factores celulares.	37
4. OBJETIVOS DEL TRABAJO.	38

MATERIALES Y METODOS.	41
1. Líneas celulares. Mantenimiento y conservación	42
2. Cepas virales utilizadas	43
3. Infección de monocapas celulares	44
4. Cuantificación de VI	44
5. Cuantificación de DI	45
6. Cuantificación de centros infectivos	45
7. Clonado de virus	46
8. Curvas de crecimiento viral.	46
9. Efecto citopático.	46
10. Purificación de virus	47
10.1. Obtención de "stocks" virales	47
10.2 Preparación de virus para la obtención de antígenos virales y como fuente de proteínas virales marcadas	48
11. Obtención de líquido ascítico de ratón hiperínfune contra virus Tacaribe (LATac)	49
12. Determinación de antígenos virales en células infectadas con virus Tacaribe, por el método de inmunofluorescencia indirecta (IFI)	49
13. Determinación del efecto de la infección viral sobre la síntesis de proteínas, ADN y ARNs celulares.	50
14. Marcación y análisis de proteínas intracelulares mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (PAA).	51
15. Análisis de ARNs virales radiactivamente marcados mediante geles de poliacrilamida (PAA).	52
16. Materiales.	53

RESULTADOS Y DISCUSION.	54
CAPITULO I.	54
A. EVALUACION DE PARAMETROS DE CRECIMIENTO DE LOS ARENAVIRUS EN CELULAS BHK ₂₁	55
1. Adsorción	55
2. Período de latencia.	56
3. Fases logarítmica y estacionaria de crecimiento viral.	56
a. Establecimiento de la fase estacionaria.	58
b. Análisis de la diferencia en los títulos máximos para los diferentes arenavirus.	60
4. Determinación del tiempo de generación viral en la fase estacionaria de crecimiento	63
B. EFECTO DE LA ACTINOMICINA D SOBRE LA REPLICACION VIRAL.	68
CONCLUSIONES.	74
CAPITULO II - PARTE I	76
A. OBTENCION DE "STOCKS" CPE (+) Y CPE (-) DE VIRUS TACARIBE	77
1. Consideraciones preliminares	77
2. Estrategia utilizada para la obtención de "stocks" virales.	78
B. EFECTO DE LA INFECCION DE CELULAS VERO CON "STOCKS" CPE (+) Y CPE (-) DE VIRUS TACARIBE.	79
1. Efecto citopático.	79
2. Efecto sobre la síntesis de macromoléculas celulares.	82
3. Relación inversa entre la inhibición de la síntesis proteica y la proporción de DI en los inóculos utilizados en la infección	89

C. EFECTO DE LA INFECCION DE DIFERENTES LINEAS CELULARES CON "STOCKS" CPE (+) DE VIRUS TACARIBE	91
 CAPITULO II - PARTE II.	 93
ANALISIS DE LA REPLICACION DE VIRUS TACARIBE EN CELULAS VERO	94
1. Caracterización de la infección.	94
2. Análisis de las proteínas virales intracelulares	101
3. Correlación entre la síntesis de proteínas virales y la inhibición de la síntesis proteica celular con la proporción de DI durante la infección.	114
CONCLUSIONES.	115
 BIBLIOGRAFIA.	 121

Indice de tablas

Tabla 1: Clasificación y distribución geográfica de los miembros de la familia arenaviridae.	15
Tabla 2: Composición proteica de los arenavirus	18
Tabla 3: Principales hospedadores naturales de los arenavirus	21
Tabla I.1: Determinación de la infectividad específica de los virus Pichinde, Tacaribe y Junín.	62
Tabla I.2: Efecto de la actinomicina D sobre la replicación de arenavirus en células BHK21	71
Tabla II.1: Medida del nivel intracelular de [³ H]-leucina en células Vero infectadas con un "stock" CPE (+) de virus Tacaribe	84
Tabla II.2: Efecto de la infección de células Vero con un "stock" CPE (+) de virus Tacaribe sobre la síntesis de ARN y ADN celular	86
Tabla II.3: Producción de virus infectivos en células Vero infectadas con "stocks" CPE (+) y CPE (-) de virus Tacaribe	88
Tabla II.4: Producción de virus infectivos libres y asociadas a células Vero infectadas con proporciones variables de DI.	89
Tabla II.5: Estudio cooperativo del efecto de la infección con un "stock" CPE (+) de virus Tacaribe sobre la síntesis de proteínas, ADN y ARN en células Vero y BHK21	92
Tabla II.6: Cuantificación de la síntesis de proteínas virales en células Vero infectadas a distintas m.d.i. con un "stock" CPE (+) de virus Tacaribe	105

Indice de figuras

Figura I.1:	Curvas de crecimiento de los virus Pichinde, Tacaribe y Junín en células BHK21	57
Figura I.2:	Efecto de la proporción de partículas DI en el momento de la infección sobre el crecimiento de virus Tacaribe en células BHK21.	59
Figura I.3:	Determinación del tiempo de generación viral para el virus Tacaribe.	66
Figura I.4:	Determinación del tiempo de generación viral para los virus Pichinde y Junín	67
Figura II.1:	Análisis de la capacidad citopatogénica de "stocks" CPE (+) y CPE (-) de virus Tacaribe	81
Figura II.2:	Efecto de la multiplicidad de infección sobre la incorporación de [³ H]-leucina en células Vero.	83
Figura II.3:	Efecto de la infección con "stocks" CPE (+) de virus Tacaribe sobre la incorporación de [³ H]-leucina en células Vero en función del tiempo post-infección.	85
Figura II.4:	Efecto de la infección con "stocks" CPE (-) de virus Tacaribe sobre la incorporación de [³ H]-leucina en células Vero en función del tiempo post-infección.	87
Figura II.5:	Relación de la proporción de partículas DI en el momento de la infección con la protección de la inhibición de la síntesis proteica	90
Figura II.6.A:	Cinética de aparición de antígenos virales totales en células Vero infectadas con "stocks" CPE (+) y CPE (-) de virus Tacaribe	96
Figura II.6.B:	Cinética de aparición de antígenos virales de superficie en células Vero infectadas con "stocks" CPE (+) y CPE (-) de virus Tacaribe	97

Figura II.7: Evaluación de la eficiencia de infección en células Vero por un "stock" CPE (+) de virus Tacaribe.	99
Figura II.8: Análisis de la producción de viriones infectivos por célula infectada.	100
Figura II.9: Caracterización de proteínas virales en células Vero infectadas con un "stock" CPE (+) de virus Tacaribe.	104
Figura II.10: Análisis bidimensional de las proteínas virales intracelulares.	107
Figura II.11: Detección de proteínas virales de vida media corta	109
Figura II.12: Cinética de aparición de proteínas virales en células Vero infectadas con "stocks" CPE (+) y CPE (-) de virus Tacaribe	111
Figura II.13: Cinética de aparición de glicoproteínas virales en células Vero infectadas con "stocks" CPE (+) y CPE (-) de virus Tacaribe.	112
Figura II.14: Efecto de la proporción de partículas DI de virus Tacaribe en la síntesis de proteínas virales intracelulares.	116
Figura II.15: Relación entre la protección de la inhibición de la síntesis proteica celular y la disminución de la velocidad de síntesis de la nucleoproteína viral.	117

Abreviaturas

ADN:	ácido desoxiribonucleico
AMD:	actinomicina D
ARN:	ácido ribonucleico
Balb/c 3T3:	células de embrión de ratón
BHK ₂₁ :	células de riñón de hamster recién nacido
cADN:	ADN copia
cél.:	célula
Ci.:	Curie (2,2 x 10 ¹² dpm)
CI:	centros infectivos
CPE:	efecto citopático
cpm:	cuentas por minuto
DI:	defectivas interferentes (partículas)
DPI:	días post-infección
dpm:	desintegraciones por minuto
EDTA:	sal disódica del ácido etilendiamino tetraacético
Fig.:	figura
g:	aceleración de la gravedad (980 cm/seg ²)
h:	horas
Hepes:	ácido 4-(2-hidroximetil)-1-piperazimetanosulfónico
HPI:	horas post-infección
IF:	inmunofluorescente
IFI:	inmunofluorescencia indirecta
Kd:	Kilo-dalton
LATac.:	líquido ascítico de ratón hiperinmune contra virus Tacaribe
LCM:	virus de la coriomeningitis linfocitaria
mARN:	ARN mensajero
m.d.i.:	multiplicidad de infección
MEM:	"Minimum Essential Medium"
min.:	minuto
PAA:	poliacrilamida
PBS:	"buffer" salino de fosfatos
rARN:	ARN ribosomal

rpm: revoluciones por minuto
S: unidad Svedberg de sedimentación (1×10^{-13} seg.)
SDS: dodecil sulfato de sodio
seg.: segundo
"stock" CPE (+): "stock" que produce CPE en células Vero
"stock" CPE (-): "stock" que no produce CPE en células Vero
TCA: ácido tricloroacético
Tris: tris(hidroximetil)aminometano
vARN: ARN viral
Vero: células de riñón de mono verde africano
VI: virus infectivos
UFP: unidades formadoras de placa
U.V: ultra violeta

INTRODUCCION

1. MIEMBROS DE LA FAMILIA ARENAVIRIDAE.

Hasta el momento trece virus han sido clasificados como miembros de esta familia (Tabla 1). El agrupamiento original se basó en su morfología: el nombre de la familia (arenavirus, del latín arenosus) deriva, precisamente, de la observación de finos gránulos en el interior de cada partícula viral, detectados al ser examinados al microscopio electrónico. Los miembros de esta familia presentan, además, similitudes en cuanto a propiedades antigénicas, fisicoquímicas y biológicas. Son virus envueltos cuyo material genético está constituido por dos segmentos de ARN de simple cadena, y se generan por brotación a través de la membrana plasmática de la célula hospedadora. El mayor o menor grado de similitud frente a pruebas de fijación de complemento (Casals y col., 1975) o inmunofluorescencia indirecta (Wulf y col., 1978) permitió dividir a la familia en dos grupos (Tabla 1): 1) virus del viejo mundo, que comprende al virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCM) y los virus Lassa, Nopcia y Mobala y 2) virus del nuevo mundo o complejo Tacaribe, que incluye a los virus Tacaribe, Junín, Machupo, Paraná, Amaparí, Latino, Tamiami, Pichinde y Flexal (Compans y Bishop, 1985). Varios miembros de la familia causan enfermedades severas y a veces mortales en el hombre. El virus LCM, ha sido detectado en numerosos casos de meningitis asépticas. Los virus Junín, Machupo y Lassa causan enfermedades hemorrágicas agudas, por lo cual representan serios problemas sanitarios en Argentina, Bolivia y Africa, respectivamente. Todas estas enfermedades son de tipo zoonótico y, salvo el caso del virus LCM que es de distribución universal, todos los miembros de la familia se localizan en zonas geográficas bien definidas. Las infecciones naturales por arenavirus afectan diferentes tejidos y son de tipo sistémico, siendo el sistema retículoendotelial el que presenta mayor tropismo (Murphy y col., 1976; 1977). Los resultados obtenidos por diferentes autores en animales de experimentación sugieren varios posibles mecanismos de acción patógena. Uno

Tabla 1: CLASIFICACION Y DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA ARENAVIRIDAE. +

	<u>Virus</u>	<u>Distribución</u>
Viejo Mundo	Lassa	Deste de Africa
	LCM #	Universal
	Mobala	República Centro Africana
	Mopeia	Mozambique
Nuevo Mundo	Anapari	Brasil
	Flexal	Brasil
	Junin	Argentina
	Latino	Bolivia
	Machupo	Bolivia
	Paraná	Paraguay
	Pichinde	Colombia
	Tacaribe	Trinidad
	Tamiami	Florida

+ Extraído de: Compans y Bishop, 1985

virus de la coriomeningitis linfocitaria

de estos se refiere a la acción citopática directa producida por la replicación intracelular de estos virus, mientras que otros involucran la participación, en una u otra forma, del sistema inmunológico del hospedador (Howard y Simpson, 1980; Pedersen, 1979; Rawls y Leung, 1979). El tipo particular de respuesta presentada por el hospedador ante una infección por un arenavirus, depende de numerosos factores entre los que merecen destacarse la edad y constitución genética del hospedador y la cepa, dosis y vía de inoculación del virus (Rawls y Leung, 1979).

2. CARACTERIZACION DE LOS VIRIONES AISLADOS.

2.1. MORFOLOGIA Y PROPIEDADES FISICAS.

Todos los miembros de la familia presentan características similares al ser estudiados por microscopía electrónica (Coto y col., 1972; Dalton y col., 1968; Lazcano y Berria, 1974; Monweiller y Lehman-Grube, 1979; Murphy y col., 1969, 1970, 1973; Murphy y Whitfield, 1975; Ofodile y col., 1973; Spier y col., 1970). Todos son altamente pleomórficos con un diámetro que varía entre 50 y 300 nm, con un valor medio de 110-130 nm. La membrana lipoproteica que constituye la envoltura externa del virión presenta numerosas proyecciones agudas (espículas) de aproximadamente 10 nm de longitud. Mediante cortes ultradelgados de preparaciones virales pudo observarse la presencia de gránulos electrodensos de 20-25 nm de diámetro, que son característicos de la familia arenaviridae (Abelson y col., 1969; Buckley y Casals, 1970; Carter y col., 1973b; Coto y col., 1972; Johnson y col., 1965; Mifune y col., 1971; Murphy y col., 1970; Ofodile y col., 1973; Pedersen, 1973). Existe evidencia suficiente que permite afirmar que dichos gránulos son ribosomas de origen celular (Farber y Rawls, 1975; Leung y Rawls, 1977; Pedersen y Konifshofer, 1976). Aparentemente el número de ribosomas asociados a cada partícula viral depende del tipo de células donde se ha formado y de la historia previa del virus y de la célula hospedadora (Vezza y Bishop, 1977; Vezza y col., 1978).

En cuanto a las propiedades físicas de los viriones se ha determinado para los virus Amaparí, Junín, LCM, Machupo, Pichinde y Tacaribe una densidad boyante en gradientes de sacarosa de 1,17-1,18 gr/ml (Gard y col., 1977; Mifune y col., 1971; Pedersen, 1970, 1973; Rawls y Buchmeier, 1975). En CsCl la densidad boyante para los virus Junín, LCM, Pichinde y Paraná resultó ser de 1,18-1,22 gr/cm³ (Gachwender y col., 1975; Mifune y col., 1971; Palmer y col., 1977; Romanowski, 1981; Webb y col., 1969). Por otra parte, se ha calculado el coeficiente de sedimentación

para diferentes arenavirus, resultando ser de 300-500 S (Pedersen, 1970; Ramos y col., 1972).

2.2. COMPOSICION QUIMICA.

2.2.1. Proteínas: El análisis de la composición proteica de diferentes arenavirus (Tabla 2) permite observar en todos los casos la presencia de una proteína mayoritaria no glicosilada que forma parte de la nucleocápside viral. Esta nucleoproteína (N) presenta un peso molecular que varía entre 60 y 72 Kd según el virus considerado. Esta nucleoproteína sería la responsable de las reacciones antigénicas cruzadas entre los diferentes arenavirus (Buchmeier y Oldstone, 1978). Los viriones aislados presentan además, una (virus Machupo, Tacaribe y Tamiami) o dos (virus Junín, Lassa, LCM y Pichinde) glicoproteínas mayoritarias que serían, probablemente, componentes principales de las espículas externas observadas en los viriones por microscopía electrónica (Buchmeier y col., 1978; Gard y col., 1977; Vezza y col., 1977). Puede observarse, además, una gran heterogeneidad en los pesos moleculares de las glicoproteínas de los diferentes arenavirus. Aún se desconoce el motivo por el cual algunos miembros de la familia presentan una única glicoproteína, mientras que otros presentan dos. El hecho de que todas estas glicoproteínas virales se generan por clivaje de un único precursor glicoproteico intracelular (de 70 Kd o más de peso molecular) (Buchmeier y Oldstone, 1979; Clegg y Lloyd, 1983; De Mitri y Martínez-Segovia, 1985; Harnish y col., 1981; Saleh y col., 1979) podría representar una diferencia interesante en cuanto al proceso de maduración de dichas proteínas. Por último, debe destacarse la existencia de una importante discordancia entre los diferentes autores en cuanto a la caracterización de los diferentes polipéptidos minoritarios (Tabla 2 y sus referencias). Entre estas proteínas minoritarias debe destacarse la presencia tanto en LCM como en Pichinde, de un polipéptido de 200 Kd (L) (Harnish y col., 1981; Martínez-Peralta y col., 1981) que ha sido postula-

Tabla 2: COMPOSICION PROTEICA DE LOS ARENAVIRUS. a

<u>Virus</u>	<u>Pichinde</u>	<u>Pichinde</u>	<u>Pichinde</u>	<u>Pichinde</u>	<u>Pichinde</u>
Referencia bibliográfica	Ramos y col. (1972)	Veza y col. (1977)	Gangemi y col. (1979)	Young y col. (1981)	Harnish y col. (1981)
	72.000 *	77.000	77.000	72.000	200.000
	72.000	-	-	-	64.000
	-	66.000	68.000	62.000	52.000 *
	-	64.000 *	65.000 *	54.000 *	48.000
	34.000 *	38.000 *	38.000 *	34.000 *	38.000
	12.000	12.000	15.000	22.000	36.000 *
				15.000	15.000
<u>Virus</u>	<u>LCM</u>	<u>LCM</u>	<u>LCM</u>	<u>Junin</u>	<u>Junin</u>
Referencia bibliográfica	Burns y col. (1983)	Buchmeier y col. (1979)	M. Peralta y col. (1981)	Segovia y De Mitri (1977)	Grau y col. (1981)
	200.000	-	230.000 *	91.000	-
	85.000 *	-	200.000	71.000	-
	77.000	63.000	85.000 *	64.000	60.000
	63.000	44.000 *	63.000	58.000 *	44.000 *
	60.000 *	35.000 *	44.000 *	38.000 *	34.000 *
	44.000 *	-	35.000 *	25.000	-
	35.000 *	-	-	-	-
<u>Virus</u>	<u>Tacaribe</u>	<u>Tacaribe</u>	<u>Tamiami</u>	<u>Machupo</u>	
Referencia bibliográfica	Gard y col. (1977)	Gangemi y col. (1978)	Gard y col. (1977)	Gangemi y col. (1978)	
	79.000	77.000	77.000	-	
	-	-	-	74.000	
	68.000	68.000	66.000	65.000	
	-	50.000	-	50.000 *	
	42.000 *	38.000	44.000 *	41.000	
	-	-	-	-	
	-	15.000	-	15.000	
<u>Virus</u>	<u>Lassa</u>	<u>Lassa</u>	<u>Mozambique</u>		
Referencia bibliográfica	Kiley y col. (1981)	Clegg, J.C.S. y Lloyd, G. (1983)	Kiley y col. (1981)		
	-	76.000	84.000 *		
	-	68.000	-		
	72.000	60.000	72.000		
	52.000 *	45.000 *	54.000 *		
	39.000 *	38.000 *	40.000 *		
	-		-		
	-		-		

a Las cifras corresponden a los pesos moleculares. Se indican con * aquellos polipéptidos glicosilados.

do como la ARN polimerasa ARN dependiente responsable de la replicación viral (Dimock y col., 1982). En el caso particular de virus Tacaribe no ha podido ser detectada una proteína específica viral con este peso molecular; no obstante, se ha observado en viriones purificados la presencia de una proteína de 105Kd, no observada en otros arenavirus (Capítulo II; Giménez y col., 1983). Por otra parte, ha sido descripta en virus Tacaribe la presencia de un polipéptido minoritario de 77-79 Kd (Gangemi y col., 1978; Gard y col., 1977); Giménez y col., 1983), el cual, al igual que la proteína p 105, no ha sido encontrado en otros arenavirus.

2.2.2. Acidos nucleicos: A diferencia de lo que ocurre con el análisis de las proteínas, el estudio de los ARNs virales permite observar una notable concordancia entre los diferentes arenavirus estudiados (Junín, LCM, Paraná, Pichinde y Tacaribe). Dichos viriones contienen como material genético dos segmentos discretos de ARN de simple cadena, de diferente tamaño. El fragmento menor (22-25 S) se simboliza normalmente con la letra S y el mayor (31-37 S) con la letra L. El peso molecular total del ARN genómico viral ha sido estimado en el rango de $3,2$ a $4,8 \times 10^6$ daltons. En todas las preparaciones virales se han encontrado, acompañando a los ARNs virales, ARNs de 4-6 S, 18 S y 28 S provenientes de los ribosomas celulares que estos viriones llevan en su interior (Abelson y col., 1969; Afion y col., 1976; Carter y col., 1973a; Dutko y col., 1981; Pedersen, 1970; Rainsing y col., 1980; Vezza y col., 1977). En algunas preparaciones de virus Pichinde se ha descripto además la presencia de un ARN de 15S (Dutko y col., 1976; Farber y Rawls, 1975). Este ARN podría ser un producto de degradación de alguno de los ARNs mencionados precedentemente; sin embargo, esto no ha sido aún confirmado. Cada una de las especies del ARN viral (L y S) codifican información genética diferente (Harnish y col., 1983; Leung y col., 1979, 1981; Vezza y col., 1978). Estudios genéticos y moleculares en virus Pichinde y LCM han permitido establecer que el segmento

S codifica la nucleoproteína y el precursor de la glicoproteína viral (Auperin y col., 1984a y b; Buchmeier y Oldstone, 1979; Harnish y col., 1983; Vezza y col., 1980). El análisis de la secuencia completa del ARN S de los virus Pichinde y LCM sugiere que la información genética para la síntesis de la proteína N estaría situada en el extremo 3' del ARN S y codificada en la secuencia complementaria del mensajero correspondiente. Es decir, el ARN del virión sería de cadena negativa para la proteína N. La información para la síntesis del precursor glicoproteico se encontraría en el extremo 5' del ARN viral, codificada en el mismo sentido que el mensajero correspondiente, esto es, el ARN viral sería de cadena positiva para el gen de la glicoproteína (Auperin y col., 1984b; Harnish y col., 1983). El secuenciamiento del ARN S del virus Tacaribe ha permitido confirmar para este virus lo hallado con anterioridad en virus LCM y Pichinde (Franze-Fernández y col., manuscrito en preparación). Estos ARNs "bisentido" ("ambisense" en inglés), aunque poco frecuentes, ya han sido descritos para otras familias de virus, como por ejemplo Bunyaviridae (Ihara y col., 1984).

Con respecto al ARN L, se desconoce hasta el momento su función específica. Sin embargo, se ha postulado a este ARN como capaz de codificar la ARN polimerasa ARN dependiente responsable de la replicación del ARN viral y de la transcripción de los ARNs mensajeros virales (Harnish y col., 1981, 1983).

2.2.3. Lípidos: Según se comentó en el punto 1, puede observarse claramente al microscopio electrónico una envoltura lipídica externa en cada partícula viral. La presencia de esta membrana explica la sensibilidad de todos los arenavirus a la acción de solventes lipídicos, agentes tensoactivos y pH extremos (Rawls y Leung, 1979). Recientemente se ha demostrado que la composición fosfolipídica de los virus Tacaribe, Junín y Pichinde es idéntica. Esta composición difiere de la composición fosfolipídica total encontrada en células infectadas, aunque es similar a la hallada en la membrana plasmática de dichas células (Rosas,

1984). Este hecho estaría de acuerdo con el proceso de brotación a través de la membrana plasmática, mediante el cual los arenavirus culminarían el proceso de morfogénesis (Murphy y Wuthfield, 1975).

3. REPLICACION DE LOS ARENAVIRUS EN CELULAS ANIMALES.

3.1. RANGO DE HOSPEDADORES.

A pesar de que una importante cantidad de animales pueden ser infectados con arenavirus en condiciones experimentales,

Tabla 3: PRINCIPALES HOSPEDADORES NATURALES DE LOS ARENAVIRUS.

<u>Virus</u>	<u>Hospedador</u>	<u>Referencia</u>
Anapari	<i>Dryomys goeldi</i> <i>Neacomys guianae</i>	Pinheiro y col. (1966)
Flexal	<i>Dryomys species</i>	Pinheiro y col. (1977)
Junín	<i>Calomys laucha</i> <i>Calomys musculinus</i> <i>Akodon azarae</i>	Parodi y col. (1958)
Lassa	<i>Mastomys natalensis</i>	Buckley y Casals (1970) Frame y col. (1970)
Latino	<i>Calomys callosus</i>	Johnson y col. (1973)
LCM	<i>Mus musculus</i>	Armstrong y Lillie (1934)
Machupo	<i>Calomys callosus</i>	Johnson y col. (1966)
Mobala	<i>Praomys jacksonii</i>	Gonzalez y col. (1983)
Mopeia	<i>Mastomys natalensis</i>	Wulf y col. (1977)
Paraná	<i>Dryomys buccinatus</i>	Webb y col. (1970)
Pichinde	<i>Dryomys albigularis</i>	Trapido y Sanmartín (1971)
Tacaribe	<i>Antibesia literates</i> <i>Antibesia jamaicensis</i>	Downs y col. (1963)
Taniami	<i>Sigmodon hispidus</i>	Calisher y col. (1970)

estos virus presentan un rango de hospedadores muy estrecho en la naturaleza. La mayoría de los arenavirus presentan un único roedor principal como hospedador (Johnson y col., 1973). Este alto grado de especificidad puede ser explicado asumiendo que los arenavirus son capaces de producir infecciones persistentes solamente en los hospedadores adecuados. Como resultado del establecimiento de una infección persistente en dichos animales, estos virus aseguran su mantenimiento en la naturaleza. La tabla 3 muestra el listado de los principales hospedadores naturales de cada arenavirus.

Con respecto a la infección de cultivos celulares, los arenavirus presentan un amplio rango de hospedadores (Hotchin, 1971; Lehman-Grube, 1971). Las líneas celulares más comúnmente utilizadas para el estudio de los arenavirus son las células BHK21 y Vero y en menor medida se utilizan células L, MDCK, HeLa, PK-13 y PK-15. De aquí en adelante nos referiremos en especial a la replicación de los arenavirus en cultivos celulares.

3.2. CARACTERIZACION DE LAS INFECCIONES POR ARENAVIRUS EN CULTIVOS CELULARES.

3.2.1. Ciclo de crecimiento viral.

Los arenavirus se adsorben a las células en cultivo en 1,5 - 2 h como máximo (Pfau, 1974). El mecanismo mediante el cual estos virus se adsorben y penetran en la célula hospedadora es aún desconocido. Con respecto a la eficiencia de infección, los datos existentes hasta el momento indican que los arenavirus no producen infecciones eficientes. La evaluación de dicha eficiencia, determinada por el método de inmunofluorescencia indirecta a 24 HPI, no supera el 66% para ninguno de los arenavirus ensayados (Buchmeier y col., 1978; Dimock y col., 1983; Martínez-Peralta y col., 1969; Rawls y col., 1976). Después de la adsorción y penetración viral sigue un período en el cual no se observa liberación de virus infectivos al medio extracelular. Este

período de latencia ha sido estimado en 6-8 h (Buchmeier y col., 1978; Lehman-Grube, 1971; Lehman-Grube y col., 1975). Sin embargo, otros autores han observado tiempos más cortos (Dutko y Pfau, 1978). En términos generales, a este período de latencia sigue la fase logarítmica de crecimiento, en la cual, la producción viral aumenta rápidamente. Este aumento continúa hasta que se alcanza la fase estacionaria de crecimiento. En esta etapa, el título viral en el sobrenadante celular se mantiene constante y es máximo. Siguiendo a esta fase se observa normalmente una notable disminución en la producción de virus infectivos. Los aspectos cuantitativos que se refieren a esta curva producción-tiempo dependen de numerosos factores, tales como la línea celular utilizada, el arnavirus estudiado, su historia previa y la multiplicidad con que se realiza la infección. Cada una de estas variables merece ser particularmente analizada. Con respecto a la línea celular utilizada para la propagación viral, se observa, en general, una diferencia notable en cuanto al título máximo obtenido. En células BHK₂₁ -la línea celular más frecuentemente utilizada para la propagación de arnavirus- se obtienen títulos máximos que varían entre 10 y 300 UFP/célula, según el virus utilizado, su historia previa y la m.d.i. utilizada. En células Balb/C 3T3, nosotros encontramos títulos similares a los obtenidos en células BHK₂₁. Sin embargo, en células Vero o MDCK los títulos máximos obtenidos son usualmente 10 a 100 veces inferiores (Dutko y Pfau, 1978; Vezza y col., 1977 y nuestras propias observaciones). Este dato resulta interesante, ya que, como veremos más adelante, los arnavirus son capaces de producir efecto citopático en células Vero y MDCK, pero replican en células BHK₂₁ y Balb/C 3T3 sin producirles modificaciones aparentes. En cuanto al virus utilizado, se observan diferencias importantes con respecto a los títulos máximos obtenidos con diferentes arnavirus crecidos en una línea celular determinada (ver Capítulo I, Dutko y Pfau, 1978). Nosotros hemos encontrado que, a pesar de que el virus Pichinde presenta en células BHK₂₁ a m.d.i. = 1 un título máximo 20 veces superior que los virus

Tacaribe y Junín, esta diferencia se debe a una mayor infectividad (UFP/mg de ARN viral) del primero y no a una mayor producción de virus, ya que, la cantidad de ARN viral liberada al medio extracelular formando parte de los viriones es similar en todos los casos (Capítulo I). El tiempo que se tarda en alcanzar el máximo en la curva de producción viral depende, principalmente, de la m.d.i. utilizada. A m.d.i. = 1, este máximo se alcanza entre las 18 y 48 HPI (Buchmeier y col., 1978; Saleh y col., 1979; Vezza y col., 1977; Capítulo I). El mecanismo mediante el cual se llega a la fase estacionaria del crecimiento viral y luego se produce el descenso en la producción viral, no ha sido aún establecido. Dutko y Pfau (1978) sugieren que este descenso en la reproducción de virus infectivos se debe a la acción de las denominadas partículas defectivas interferentes (ver más adelante). Sin embargo, Dimock y col. (1982) consideran que la disminución de la producción de virus infectivos no dependería de la generación de partículas defectivas interferentes, sino que representaría un mecanismo de autorregulación, que estos autores sugieren podrían estar mediados por productos del ARN S.

3.2.2. Partículas defectivas interferentes.

En el punto anterior se ha analizado la variación de la producción de viriones infectivos y capaces de engendrar progenie (VI) en función del tiempo. Sin embargo, para la mayoría de los virus animales, la proporción de partículas que reúnen estas condiciones representa entre una décima y una millonésima parte de las partículas totales liberadas al medio extracelular por las células infectadas (Fenner y col., 1974). La fracción restante corresponde a partículas que, por diferentes motivos, son incapaces de autorreplicarse. Desde el punto de vista molecular la causa de esta pérdida de autosuficiencia para la replicación puede enmarcarse en dos grupos diferentes: 1) las debidas a alteraciones en el material genético y 2) las originadas por alteraciones en la composición proteica del virus. Las primeras,

es decir las debidas a modificaciones en el genoma viral, son las más frecuentes e incluyen mutaciones, deleciones y pérdida de fragmentos en el caso de virus con genoma segmentado. Todas aquellas partículas cuyo genoma presente estos "defectos" son denominadas partículas defectivas. En algunos casos se observa la pérdida total del material genético, lo cual da lugar a la formación de las denominadas partículas vacías (Fenner y col., 1974). Algunas alteraciones en la composición proteica conducen a la formación de partículas incapaces de autorreplicarse; por ejemplo: la modificación de la estructura de alguna proteína de la nucleocápside viral puede generar partículas fácilmente inactivables (el material genético de estas partículas puede ser más accesible a nucleasas o más sensible a la acción del calor, la luz, etc); la alteración de una proteína interna necesaria para mantener la conformación espacial de los distintos componentes en la partícula viral, o bien la modificación de alguna proteína externa, pueden originar partículas incapaces de unirse a los sitios de reconocimiento (receptores) en la membrana plasmática de la célula hospedadora. Por último, la pérdida de actividad de algunas proteínas necesarias para la transcripción primaria del genoma de algunos virus (por ejemplo una transcriptasa reversa) genera viriones que, luego de penetrar en la célula hospedadora, son incapaces de replicarse (Fenner y col., 1974). Es evidente que pueden obtenerse, además, partículas con todas las combinaciones posibles entre los defectos mencionados. Si bien ninguna de estas partículas defectuosas con alteraciones en el genoma, en la composición proteica o en ambos son capaces de replicar por sí mismas, muchas de ellas pueden introducir componentes virales en la célula infectada que interfieren con la replicación normal de los VI. Esta interferencia es producida, casi exclusivamente, por las partículas defectivas, es decir por aquellas partículas con defectos importantes en el genoma viral. Estas partículas defectivas interferentes han sido frecuentemente observadas en numerosos virus animales como por ejemplo, en influenza virus (Von Magnus, 1951),

en poliovirus (Cole y col., 1971), en reovirus (Nonoyama y Graham, 1970), en rabdovirus (Huang y col., 1966), adenovirus (Mack, 1971), etc. y también en algunos virus vegetales (Huang, 1973) y bacteriófagos (Enea y Zinder, 1975). Estas partículas se generan espontáneamente durante la multiplicación de los virus infectivos normales (VI), como resultado de fallas en la replicación del genoma viral (Bruton, 1976; Huang y Palma, 1974; Murray y col., 1975; Portner y Kingsbury, 1972; Welsh y Pfau, 1972; Welsh y col., 1972). Se ha demostrado que estas fallas se producen al azar (Holland y col., 1976; Janda y col., 1979) y resultan ser, generalmente, deleciones (Bruton y Kennedy, 1976; Cole y col., 1971; Huang y Wagner, 1966; Kingsbury y col., 1970) y/o pérdida de fragmento(s) en el caso de virus con genoma segmentado (Nonoyama y Graham 1970; Pons y Hirst, 1969). Como se comentó anteriormente, las partículas que portan este material genético defectuoso son incapaces de replicarse en forma autónoma cuando infectan una célula. Necesitan para ello de la replicación simultánea (en la misma célula) de una partícula normal (VI) que le provea de los elementos que ella no puede sintetizar. Huang y Baltimore (1970) propusieron la denominación de defectivas interferentes (DI) a dichas partículas y les asignaron las siguientes propiedades principales: 1) Interfieren con la replicación intracelular del virus homólogo normal (VI); 2) Contienen proteínas virales estructurales idénticas a las de las partículas infectivas; 3) Poseen su material genético defectuoso (generalmente deleción); 4) Sólo pueden replicarse en presencia del VI.

En el caso particular de los arenavirus se ha podido detectar, en sobrenadantes de células infectadas y fluidos biológicos, actividad interferente. Esta actividad interferente se puede medir por la capacidad que dichos fluidos presentan para reducir la producción de VI en algunos cultivos celulares o de inhibir la formación de placas en células sensibles (Popescu y col., 1976; Welsh y Pfau, 1982). Sin embargo, el estudio de las propiedades de las partículas DI de arenavirus se ha visto obstaculiza-

do por la dificultad que representa separar dichas partículas DI de los VI. Como se mencionó antes, los arenavirus son pleomórficos y la separación de las partículas DI de los VI mediante el uso de métodos fisicoquímicos resulta complicada. Debido a este hecho, la mayor parte de los estudios tendientes a demostrar las propiedades de las DI de arenavirus han sido llevados a cabo con partículas obtenidas de cultivos celulares persistentemente infectados, los cuales producen niveles mínimos de VI (Rawls y Leung, 1979). Tal vez, el hecho de no haber trabajado con entes particulados física y bioquímicamente definidos haya sido la causa de los resultados contradictorios observados por distintos autores al intentar caracterizar las partículas DI de diferentes arenavirus. Por ejemplo, con respecto al análisis del carácter defectivo del material genético los resultados son confusos. En los virus LCM y Paraná se ha observado una mayor resistencia a la irradiación con luz U.V. de la actividad interferente con respecto a la capacidad formadora de placas (Staeneck y Pfau, 1974; Welsh y col., 1972), lo que sugiere que el genoma de las DI podría ser más pequeño que el de los correspondientes VI. Las DI obtenidos de células persistentemente infectadas con virus Paraná mostró la falta del ARN S genómico viral (Dutko y col., 1978). Sin embargo, para el virus LCM, el análisis comparativo de los ARNs virales de las partículas DI y los VI ha arrojado resultados contradictorios: algunos autores (Martínez-Peralta y col., 1981) encuentran pérdida del ARN S en el caso de las DI, mientras que otros (Welsh y col., 1975) no observan diferencia en el material genético de las DI y los VI. Con respecto al genoma de las DI del virus Pichinde, se han observado importantes alteraciones en los electroforegramas del ARN en función del número de pasaje de las células persistentemente infectadas utilizadas para su obtención (Dutko y col., 1976). Las razones por las cuales se observan estas variaciones entre los diferentes trabajos no son claras. Aunque, como se indicó antes, es probable que esto esté relacionado con la metodología empleada para la obtención de las partículas

DI. De todo esto se desprende que la falta de integridad genómica de las DI de los diferentes arenavirus es aún desconocida, por lo cual no puede afirmarse que las partículas en cuestión sean realmente defectivas. Con respecto a las proteínas estructurales de las DI, la incertidumbre es similar a la encontrada para los ARNs. Mientras que algunos autores (Welsh y col., 1975) encontraron en virus LCM perfiles electroforéticos idénticos entre las proteínas de las DI y los VI, otros (Martínez-Peralta y col., 1981) encontraron, para el mismo arenavirus, diferencias importantes en su composición proteica. Por último, nada se sabe acerca de la capacidad de autorreplicación de las DI de los arenavirus. No se ha demostrado aún que estas partículas sean capaces de replicarse por sí mismas, aunque tampoco se ha demostrado lo contrario. Sin embargo, ciertas evidencias sugieren que estas partículas DI necesitan la participación de los VI para autorreplicarse. Por ejemplo, la replicación viral en cultivos celulares infectados con baja m.d.i. (condición en que no se favorece la coinfección de células con VI y DI) produce, generalmente, bajos niveles de DI, mientras que la replicación en cultivos infectados con alta m.d.i. (donde hay una mayor probabilidad de coinfección) produce, generalmente, niveles elevados de DI en los sobrenadantes celulares (Dutko y Pfau, 1978; Welsh y Pfau, 1972).

Resumiendo, el análisis detallado de cada una de las propiedades básicas asignadas a las partículas DI en general (Huang y Baltimore, 1970) para el caso particular de los arenavirus, permite evidenciar incertidumbre en el conocimiento de las mismas. Por lo tanto, se desea dejar bien sentado que, a pesar de no estar de acuerdo en denominar defectivas interferentes a las mencionadas partículas, en el presente trabajo se usará esta nomenclatura por estar ampliamente difundida entre los autores dedicados al estudio de los arenavirus.

3.2.3. Establecimiento de infecciones persistentes.

El establecimiento de infecciones persistentes en células en cultivo ha sido descrito en numerosos sistemas virales (Preble y Youngner, 1975; Walker, 1964). La generación de partículas DI constituye uno de los mecanismos más importantes en el establecimiento de las infecciones persistentes (Friedman y Ramseur, 1979). Su participación en infecciones crónicas ha sido demostrada para numerosos virus (Barasky y Cornefert, 1962; Holland y Villarreal, 1974; Inglot y col., 1973; Kawai y col., 1975; Kiley y col., 1974; Lazzarini y Scolnick, 1976; Rima y col., 1977; Roux y Holland, 1979; Rustigian, 1962).

Como se verá más adelante (3.2.4), los virus en su interacción con la célula hospedadora pueden provocar infecciones líticas y no líticas. En este último caso, el establecimiento de la persistencia se logra mediante el mantenimiento continuo del cultivo celular infectado. Sin embargo, en el caso de las infecciones líticas, la persistencia sólo puede lograrse a partir de las células sobrevivientes a dicha lisis. Con el objeto de prevenir o disminuir el efecto citopático y lograr el establecimiento de infecciones crónicas, se ha recurrido frecuentemente al uso de anticuerpos (Gould y Linton, 1975), de interferón (Nishiyama, 1977; Preble y Youngner, 1972), de partículas DI (Rima y col., 1977; Roux y Holland, 1979), etc.

En el caso particular de los arenavirus, la replicación en algunos sistemas celulares (BHK₂₁, Balb/C 3T3) procede sin provocar efectos apreciables sobre la viabilidad celular. En otros cultivos celulares (MDCK, Vero, PK-15), sin embargo, la replicación viral causa, en determinadas condiciones, la lisis de una fracción variable de las células que constituyen la monocapa. Como se mencionó poco antes esta monocapa puede reconstituirse totalmente a partir de las células sobrevivientes. En cualquiera de los dos casos se logra el establecimiento de infecciones persistentes (Boxaca, 1970; Lehman-Grube y col., 1969; Staeneck y col., 1972; Traub y Kesting, 1963) en las cuales los cultivos infectados con arenavirus se comportan de igual

forma que los no infectados. Dichas infecciones crónicas reducen notablemente la capacidad de sobreinfección con el mismo u otros arenavirus (Boxaca, 1970; Boxaca y col., 1972). Sin embargo la respuesta a la sobreinfección por arenavirus no es uniforme para todos los miembros del grupo (Damonte y col., 1983). El establecimiento de la persistencia provoca la inhabilidad del sistema para producir partículas infectivas en etapas tardías de la infección (Lehman-Grube y col., 1969). A pesar de ello, puede observarse inmunofluorescencia específica en los cultivos infectados y la liberación al medio de cultivo de partículas interferentes (Damonte, y col., 1981; Help y col., 1976; Help y Coto, 1980; Lehman-Grube, 1969; Oldstone y col., 1977; Staeneck y col., 1972; Welsh y col., 1972; Welsh y Oldstone, 1977). Se ha sugerido que la presencia de dichas partículas en los "stocks" de arenavirus usados durante la infección, podría ser la causa de la disminución o eliminación total de la capacidad citolítica de estos virus en células susceptibles (ver Capítulo II, Dutko y Pfau, 1978; Popescu y col., 1976) facilitando así el establecimiento de la persistencia viral. Sin embargo, el mecanismo molecular mediante el cual se establece y mantiene dicha persistencia en cultivos celulares infectados con arenavirus es aún desconocido. Aparentemente, las partículas DI jugarían un papel fundamental en la regulación de la replicación de los viriones infectivos y la síntesis de sus antígenos (Pedersen, 1979). Sin embargo, extractos libres de células, obtenidos a partir de células persistentemente infectadas y que no muestran evidencia de poseer partículas defectivas interferentes, también son capaces de establecer la persistencia viral (Van der Zegiat y col., 1983). Es evidente que debe obtenerse mayor información con respecto al fenómeno de interferencia viral si se desea establecer cuales son los eventos moleculares que permiten el establecimiento y el mantenimiento de la persistencia.

3.2.4. Efecto citopático.

La infección de diversos cultivos celulares con diferentes sistemas virales generan en las células hospedadoras una importante variedad de efectos morfológicos y cambios bioquímicos (Shatkin, 1983). Estos efectos varían en intensidad según las diferentes combinaciones virus-célula e involucran, probablemente, la superposición de varios mecanismos que culminan, generalmente, con la lisis celular. La influencia de la célula hospedadora sobre la capacidad citolítica de diferentes virus es notable; por ejemplo, el paramixovirus SV5 es capaz de replicar en cultivo primario de células de riñón de mono sin producir efectos apreciables sobre dichas células, sin embargo, su replicación en células de hamster conduce rápidamente a la lisis celular (Holmes y Choppin, 1966). En la mayoría de los casos el efecto citopático (CPE) y la lisis celular son consecuencia directa de la replicación viral (competición de los mARNs virales con los celulares, degradación de los mARNs celulares, inhibición específica de la síntesis proteica por la formación de polipéptidos inducidos por la replicación viral, etc). No obstante, en algunos casos particulares el CPE se produce sin necesidad de que el virus se replique (proteínas constitutivas virales tóxicas) (Shatkin, 1983).

Con respecto al caso particular de los arenavirus, su capacidad para producir CPE en cultivos celulares está aún en discusión (Pedersen, 1979). En la mayoría de los casos el CPE está ausente o es poco evidente, sobre todo cuando la infección se lleva a cabo con una m.d.i. elevada. Debido a ello los arenavirus son considerados como no citopatogénicos (Pedersen, 1979; 4th Report of the International Committee for Taxonomy of Viruses, 1982). Sin embargo, Dutko y Pfau (1978) observaron un marcado efecto citopático en células MDCK y PK-15 infectadas con virus LCM y Pichinde, aunque, en ningún caso, lograron provocar la lisis total de la monocapa celular. Dichos autores sugirieron que la presencia de DI en los "stocks" virales utilizados durante la infección, protegería a las células del CPE. Por otra parte,

se ha descrito que la infección a elevada m.d.i. de células Vero con diferentes arenavirus es incapaz de provocar CPE. Este hecho es llamativo, ya que dichas células se utilizan normalmente para titular arenavirus por plaqueo en medio sólido. Como se mostrará en el Capítulo II, hemos logrado obtener "stocks" de virus Tacaribe capaces de inducir lisis total de la monocapa en células Vero. Dichos "stocks" presentan una muy baja proporción de partículas DI. No conocemos aún el mecanismo mediante el cual el virus Tacaribe genera el CPE. Sin embargo, hemos encontrado que dicho efecto se encuentra asociado a una importante inhibición de la síntesis de macromoléculas celulares (Capítulo II). Sabemos también que es necesaria la expresión del genoma viral para la producción de ambos efectos, ya que éstos no se observan infectando células con virus inactivados por radiación U.V. (observación no publicada).

3.2.5. Efecto de la replicación viral sobre la síntesis de macromoléculas celulares.

En la mayoría de los sistemas virales el CPE se observa asociado con la inhibición de la síntesis de macromoléculas celulares. En general, el blanco primario resulta ser la síntesis proteica (Shatkin, 1983).

De igual forma que lo observado para el CPE, el desarrollo de la inhibición de la síntesis de macromoléculas depende mucho de la célula hospedadora. Por ejemplo, la síntesis proteica en células L (fibroblastos de ratón) es notablemente inhibida en células infectadas con reovirus tipo 3 (Detjen y col., 1982; Skup y Millword, 1980) o con el virus de la encefalomiocarditis (Jen y Tach, 1982), en tanto que en células SC-1 (otra línea de fibroblastos de ratón) la infección con dichos virus no afecta en forma directa la síntesis proteica (Detjen y col., 1982; Jen y Tach, 1982). Los mecanismos mediante los cuales se produce la mencionada inhibición son diversos y dependen estrictamente del sistema virus-célula. Por ejemplo, en el caso de células HeLa infectadas con poliovirus se encontraron modificaciones

en los factores de iniciación que provocarían una traducción casi exclusiva del mRNA viral (Helentjaris y Ehrenfeld, 1978). Los virus Herpes Simplex-1 y el virus de la plaga de las aves en diversas líneas celulares son capaces de favorecer la degradación de los mARNs celulares (Inglis, 1982; Nishioka y Silverstein, 1978). La replicación de adenovirus en células HeLa provoca una disminución en la proporción de mARNs celulares a expensas de un transporte nucleocitoplasmático selectivo en favor de los transcriptos virales (Beltz y Flint, 1979). Otros sistemas virales son capaces de inducir cambios en la permeabilidad celular, que modifican el equilibrio salino intracelular; esto provocaría una inhibición selectiva en la iniciación de la traducción, favoreciendo la traducción de los mARNs virales (Carrasco y Smith, 1980; Garry y col., 1979).

En el caso particular de los arenavirus, los resultados encontrados por numerosos autores (Buchmeier y col., 1978; Giménez y col., 1983; Oldstone y col., 1977; Rawls y Leung, 1978; Saleh y col., 1979) sugieren que los miembros de esta familia de virus son incapaces de afectar la síntesis de macromoléculas celulares. Estas observaciones llevaron a clasificar a los arenavirus como incapaces de afectar los procesos celulares vitales (Pedersen, 1979, Fourth Report of International Committee for Taxonomy of Viruses, 1982). Sin embargo, como se demuestra en el Capítulo II del presente trabajo, la infección de células Vero con "stocks" de virus Tacaribe conteniendo una baja proporción de partículas DI produce inhibición en la síntesis de macromoléculas celulares (proteínas y ácidos nucleicos) de hasta un 70-75% con respecto a los controles no infectados. Como se verá más adelante esta inhibición en la síntesis de macromoléculas celulares presenta una importante correlación con la aparición del CPE y, al igual que éste, puede ser disminuido o eliminado mediante el aumento de la cantidad de DI en el momento de la infección. No conocemos aún el mecanismo mediante el cual se produce esta inhibición.

3.3. SINTESIS DE PROTEINAS Y ARN_v VIRALES EN LAS CELULAS INFECTADAS.

3.3.1. Síntesis de proteínas virales intracelulares.

La síntesis de proteínas virales intracelulares se ha estudiado, hasta el momento, en cultivos celulares infectados con virus Pichinde, LCM, Lassa, Junín y Tacaribe. Estos estudios se han concentrado principalmente en la detección de la nucleoproteína viral, el precursor de la(s) glicoproteína(s) viral(es) y unos pocos polipéptidos minoritarios.

En células BHK₂₁ infectadas con virus Pichinde se ha detectado, a partir de las 12 HPI, la aparición de la nucleoproteína viral (N de 64 Kd) y el precursor de las glicoproteínas virales (GPC de 79 Kd), que también es glicosilado. Además se ha observado -mediante inmunoprecipitación con anticuerpos específicos- la aparición de una proteína de 200 Kd que ha sido propuesta como la ARN polimerasa viral (Dimock y col., 1982; Harnish y col., 1981). En células BHK₂₁ infectadas con virus LCM se ha detectado la nucleoproteína viral (N de 63 Kd) a partir de las 6 HPI y se ha observado la aparición, a partir de las 24 HPI, de una glicoproteína (GPC de 75 Kd) precursora de las glicoproteínas Gp1 y Gp2 constitutivas del virión (Buchmeier y col., 1978; 1979). A pesar de que en el virión aislado se ha podido detectar una proteína de 200 Kd (Burns y col., 1983; Martínez-Peralta y col., 1981), debido a la falta de inhibición de la síntesis de proteínas celulares (Buchmeier y col., 1978) ésta no se ha detectado en la célula hospedadora. Por otra parte, en células infectadas con virus Lassa se hallaron cuatro proteínas virales: la nucleoproteína de 60 Kd, las glicoproteínas estructurales de 38 y 45 Kd y una glicoproteína de 72 Kd, probable precursor de estas últimas (Clegg y Lloyd, 1983). La infección de células BHK₂₁ con virus Junín permitió detectar la aparición de la nucleoproteína viral (N de 60 Kd) y de dos glicoproteínas de 33 y 57 Kd, recién a partir de las 48 HPI (Rustici, 1984). Sin embargo, otros autores (De Mitri y Martínez-Segovia, 1985), mediante

inmunoprecipitación con antisueros específicos, observaron la aparición de la nucleoproteína N (de 64 Kd) a partir de las 24 HPI. A partir de las 48 HPI estos autores observaron, además, la aparición de dos glicoproteínas de 72 Kd y de 38 Kd, cuya relación precursor producto se demostró. También han podido detectar una proteína de 200 Kd. Por último, Saleh y col., (1979), en células BHK₂₁ infectadas con virus Tacaribe, observaron a partir de las 24 HPI la síntesis de la nucleoproteína viral. Recién después de las 36 HPI estos autores observan la aparición de dos glicoproteínas, una de 70 Kd -precursora de la glicoproteína estructural- y otra de 42 Kd -estructural-. Por otra parte, también han sido descriptos en células infectadas con virus Tacaribe, una serie de polipéptidos minoritarios de aparición tardía; estos son: el polipéptido P de 77-79 Kd (Compans y col., 1981); los polipéptidos P₇₉ y P₁₀₅ (Giménez y col., 1983) y un polipéptido de 73 Kd, probable precursor de la glicoproteína viral (Boersma y col., 1985). Debe destacarse que las proteínas de 73, 79 y 105 Kd no han sido observadas en cultivos celulares infectados con otros arenavirus y que, en células infectadas con virus Tacaribe, no se ha observado la proteína de 200 Kd detectada con Pichinde, LCM y Junín. Como se verá en el Capítulo II, en las células Vero infectadas con virus Tacaribe nosotros hemos observado la síntesis de la nucleoproteína viral de 68 Kd y de una glicoproteína de aproximadamente 72 Kd a partir de las 6 HPI. A partir de las 12 HPI pudimos detectar la síntesis del polipéptido P₇₉ y de una proteína de 105 Kd que podría corresponder a la observada por Giménez y col. (1983). Al igual que estos autores no hemos podido detectar en células infectadas con virus Tacaribe la síntesis de ningún polipéptido de 200 Kd inducido por la replicación viral. Debe destacarse además, que en ningún momento después de la infección hemos podido detectar dentro de las células infectadas (tanto Vero como BHK₂₁) la aparición de la glicoproteína estructural (38 Kd).

3.3.2. Replicación del ARN viral.

Hasta el momento no existe información sobre la secuencia de eventos moleculares implicados en la replicación intracelular del ARN viral.

Según nuestra experiencia, usando actinomicina D para inhibir la síntesis del ARN celular y marcando con uridina radioactiva, puede ser observada en células Vero y BHK21 infectadas con virus Tacaribe la síntesis de los ARNs L y S virales, a partir de las 8 HPI (observaciones no publicadas). Sin embargo, debido a la baja proporción de ARNs virales intracelulares (menor del 1% del ARN celular total, según nuestras observaciones en células infectadas con virus Tacaribe y Junín) y la baja sensibilidad de la metodología empleada, no hemos podido detectar otros ARNs de origen viral (mensajeros virales, intermediarios de replicación, etc.). Por otra parte, este método no permite determinar si los ARNs L y S detectados corresponden, cada uno, a las cadenas del ARN genómico viral, o a las del ARN viral complementario o a ambas. Mediante el uso de técnicas de ingeniería genética, la síntesis de "sondas" de ADNs específicos virales radiactivamente marcadas, ha permitido mejorar esta situación. El uso de estas "sondas" radiactivas y la aplicación de técnicas de hibridación molecular al análisis de los ARNs virales intracelulares ha permitido detectar a las 24 HPI en células BHK21 infectadas con virus Pichinde, el ARN genómico viral, el ARN viral complementario y dos ARNs subgenómicos correspondientes al ARN S (Auperin y col., 1984a, 1984b). Se demostró que uno de estos ARNs subgenómicos -codificado en el extremo 3' del ARN S- es el mRNA de la nucleoproteína viral. El otro ARN subgenómico se supone que codifica para la síntesis de la glicoproteína GPC y se transcribe desde el extremo 5' del ARN S (Auperin y col., 1984b). No existe información con respecto a los eventos intracelulares que se refieren a la replicación de la cadena L del ARN viral. Sólo se ha sugerido la presencia de una fracción subgenómica en células infectadas con virus LCM (Riviere y col.,

1985) Tampoco se conoce con certeza cuáles son las proteínas codificadas por el fragmento L del ARN viral.

3.4. REQUERIMIENTO DE FACTORES CELULARES.

Con el objeto de analizar la participación de funciones celulares durante la replicación de virus cuyo genoma es ARN, se ha estudiado el efecto de diferentes inhibidores de la transcripción celular sobre la producción viral. La actinomicina D ha sido la droga más ampliamente utilizada con este fin. Ha permitido demostrar que la replicación del virus de la poliomielitis, el virus Coxsackie A9, el virus de la enfermedad de Newcastle, el virus Sindbis, el virus de la estomatitis vesicular, el virus Sendai y otros, no necesitan de la transcripción celular para su replicación, mientras que otros virus, como el virus de la gripe, el virus del sarcoma de Rous, el virus de la plaga de las aves, etc., necesitan de la transcripción del ADN del hospedador para su replicación (Ver revisión en Reich y Goldberg, 1964).

En el caso particular de los arenavirus, estudios llevados a cabo con virus LCM y Pichinde mostraron que la actinomicina D afectaba drásticamente la producción viral determinada a 24-96 HPI (Buck y Pfau, 1969; Mifune y col., 1971; Rawls y col., 1976; Stanwick y Kirk, 1971). El mismo fenómeno se observó en células infectadas con virus Tacaribe tratadas con α -amanitina (Mersich y col., 1979) y en células infectadas con virus Pichinde enucleados mediante el uso de citochalasina B (Banerjee y col., 1975/1976). Sin embargo, en todos los casos el análisis de la producción viral fue realizado después de tratamientos prolongados con las drogas mencionadas. En estas condiciones el análisis de los resultados obtenidos se hace complicado debido a que es difícil discernir entre un efecto específico sobre la replicación viral y un efecto tóxico sobre las células hospedadoras causadas por la acción de las drogas. En esta tesis se demuestra (ver Capítulo I) que dosis elevadas de actinomicina D no afectan la producción de virus Tacaribe, Junín y Pichinde, cuando

se extremen las condiciones para reducir el efecto tóxico de la droga sobre las células. Esto permitió concluir que la replicación de arenavirus no necesita de la transcripción celular simultánea, ni inmediatamente después de la infección, ni en la fase estacionaria de crecimiento viral (ver Capítulo I). No se descarta, sin embargo, la posibilidad de que el virus necesite transcriptos de vida media larga u otras funciones nucleares (distintas de la transcripción) para su replicación.

4. OBJETIVOS DEL TRABAJO.

Con la finalidad de encarar el estudio de los eventos moleculares en las infecciones por arenavirus, es necesario conocer previamente aspectos biológicos básicos de la replicación de estos virus y de su interacción con la célula hospedadora. En la primera parte del presente trabajo se estudian problemas biológicos básicos de estos virus, haciendo incapié en el análisis de hechos desconocidos o aún en discusión acerca de la replicación viral y la interacción virus-célula.

En el primer capítulo se investiga la replicación de tres arenavirus en células BHK₂₁. Se aborda aquí el estudio del ciclo replicativo de los virus Junín, Tacaribe y Pichinde, analizando cada una de sus etapas: la adsorción, el período de latencia y las fases logarítmica y estacionaria de crecimiento. Se determinó la constante de adsorción viral, el período de latencia y la infectividad específica en la fase estacionaria de crecimiento para cada uno de los arenavirus estudiados. Se investigó la posible participación de las partículas DI en el establecimiento de la fase estacionaria de crecimiento del virus Tacaribe. Se analizó, además, el tiempo de generación viral para los virus Junín, Tacaribe y Pichinde en dicha fase de crecimiento (tiempo necesario para que cada uno de estos virus sintetice su material genético, se ensamble y se libere al medio extracelular formando una partícula viral completa). Debe destacarse que el conocimiento de estos parámetros, además de aportar información original

sobre el sistema, permitió progresar en el estudio del mismo. Un ejemplo claro de ello lo constituye la determinación del efecto de la actinomicina D sobre la replicación de los tres arenavirus mencionados. Gracias al conocimiento del tiempo de generación viral pudo determinarse el efecto de la actinomicina D sobre la replicación viral (Capítulo I), definiendo así un aspecto repetidamente discutido para esta familia de virus.

En el Capítulo II se estudia la replicación del virus Tacaribe en células Vero, encarando preferentemente la interacción virus-célula. Se intenta aquí dar una explicación a un hecho paradójico, frecuentemente observado por diferentes autores durante la replicación de arenavirus en células Vero (ver Introducción): mientras que estos virus producen placas de lisis en dichas células cuando se infecta con baja m.d.i., no se observan efectos apreciables sobre la integridad celular al infectar con m.d.i. elevadas. Ciertas consideraciones (ver Capítulo II) nos llevaron a suponer que estos hechos estarían relacionados con la presencia de partículas DI en los "stocks" virales. A partir de dichas consideraciones surgieron las siguientes hipótesis: a) "stocks" de virus infectivos deberían producir lisis celular; b) como se observa en la mayoría de los virus citopatógenicos (ver Introducción) debería haber inhibición de la síntesis de macromoléculas celulares; c) el efecto citopático y la inhibición de la síntesis de macromoléculas celulares (si se produjeran) podrían ser eliminadas por la presencia de DI (ver Introducción). Con el objeto de analizar la factibilidad de cada una de estas hipótesis, desarrollamos condiciones para la preparación de "stocks" ricos en D.I. [CPE (-)] y pobres en DI [CPE (+)]. Este hecho nos permitió, por una parte, verificar la veracidad de las hipótesis inicialmente planteadas, pero, por otra parte, nos abrió una nueva posibilidad, la de utilizar este sistema para comenzar a indagar acerca de los eventos moleculares que llevan al desarrollo del efecto citopático y la inhibición de la síntesis proteica celular y de cuáles son las diferencias, a nivel molecular, que llevan a una infección lítica

o a una infección no lítica. Para ello debimos caracterizar, en primer lugar, el sistema desde el punto de vista biológico (se analizó la eficiencia de infección viral y la capacidad de las células infectadas para producir virus infectivos) y desde el punto de vista molecular (se caracterizaron las proteínas virales intra y extracelulares). Una vez definido el sistema, analizamos, a nivel molecular, el posible efecto de las DI sobre la replicación de los VI y la probable vinculación de estos eventos moleculares con el desarrollo del efecto citopático y de la inhibición de la síntesis de proteínas celulares. Debe destacarse que estos estudios constituyen un análisis básico del sistema que nos permitirá avanzar en un proyecto más ambicioso que incluye, además del análisis de la síntesis de proteínas virales, el estudio de la replicación del ARN viral, la producción de mARNs virales, intermediarios de replicación, etc., durante las infecciones lítica y no lítica.

MATERIALES Y METODOS

1. Líneas celulares. Mantenimiento y conservación.

Durante el desarrollo del presente trabajo se han utilizado células BHK21 clon 13 crecidas en monocapa (fibroblastos de riñón de hamster lactante -*Mesocricetus auratus*-; Stocker y Mac Pherson, 1961) y células Vero (fibroblastos de riñón de mono verde africano -*Cercopithecus aethiops*-; Yasumura y Kawatice, 1963). Ambas líneas celulares fueron mantenidas durante sucesivos pasajes en botellas cerradas de material descartable (generalmente de 25 cm² de superficie). La composición de los medios de cultivo utilizados fue la siguiente:

Línea celular	<u>Vero</u>	<u>BHK21</u>		
Medio de cultivo base	MEM (Earle)-Gibco	MEM (Glasgow)-Gibco		
Suplementado con:				
Suero equino-Gibco	5% (medio de crecimiento)	-		
	2% (medio de mantenimiento)	-		
Suero bovino	-	5% (medio de crecimiento)		
(ternero)-Gibco	-	1% (medio de mantenimiento)		
	<u>Frasco cerrado</u>	<u>Cajas de Petri</u>	<u>Frasco cerrado</u>	<u>Cajas de Petri</u>
Penicilina	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml
Estreptomicina	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml
NaHCO ₃	0.8 gr/lt	2.0 gr/lt	0.8 gr/lt	2.0 gr/lt
ries pH=7.4	-	10 mM	-	10 mM

Para el mantenimiento de ambas líneas celulares se utilizó la siguiente metodología:

- Al llegar a saturación total (monocapa celular completa) las células se desprendieron de la monocapa con tripsina 0,25% en solución salina de fosfatos (PBS).
- Se resuspendieron las células en el medio de cultivo adecuado, se homogeneizó la suspensión y se trasvasó una cantidad adecuada (aproximadamente 1×10^4 células/cm²) a una nueva botella conteniendo medio de cultivo fresco.
- Se incubaron las células en botella cerrada a 37°C.
- Se realizaron cambios de medio de cultivo cada 48 hs, regulando la velocidad de crecimiento mediante la modificación de la concentración de suero en el medio de cultivo.

Para la siembra de cajas de Petri se procedió en forma similar. Se utilizó en este caso el medio de cultivo correspondiente y la incubación de las células se realizó a 37°C en atmósfera de CO₂ (5% de CO₂ en aire).

Para la conservación de las líneas celulares se congelaron a -196°C (N₂ líq.) pasajes bajos de células (44 para células Vero y 26 para células BHK₂₁) en 1 ml de medio de cultivo suplementado con 10% de glicerol y 20% del suero correspondiente, a razón de 10⁶ células/ml. Para la recuperación de dichas células, se descongelaron rápidamente en un baño a 37°C con agitación enérgica y se sembraron 10⁶ células/25cm² en el medio de cultivo correspondiente suplementado con 10% de suero.

Las células Vero, provenientes de la "American Type Culture Collection" (ATCC), fueron mantenidas entre los pasajes 48 y 60. Las células BHK₂₁ cl. 13, también provenientes de la ATCC, fueron mantenidas entre los pasajes 28 y 60. Periódicamente se verificó la ausencia de micoplasma utilizando el método de Schneider y col. (1974).

2. Cepas virales utilizadas.

El virus Tacaribe (cepa TRVLII573 de C.T. Pfau, Rensselaer Polytechnical Institute, Troy, N.Y., E.E.U.U.) fue gentilmente

proviesto por la Dra. M. Weissenbacher (Facultad de Medicina, U.B.A.); el virus Junín (cepa MC₂) fue cedido por la Dra. Z. Martínez-Segovia (Instituto Nacional de Microbiología, "Dr. Carlos Malbrán") y el virus Pichinde (cepa AN3739) fue provisto por el Dr. C. Sanmartín (Cali, Colombia).

3. Infección de monocapas celulares.

El número de células utilizado durante la infección dependió de la línea celular y del uso posterior que se les fuera a dar. La infección de células BHK₂₁ para la producción de virus fue llevada a cabo en frascos cerrados con una densidad de células en la monocapa -salvo indicación contraria- de aproximadamente 2×10^5 cél./cm² y 2×10^4 cél./cm² cuando se infectaron con m.d.i. < 0.1 y m.d.i. > 1 UFP/cél., respectivamente. La infección de células para experimentos específicos, se llevó a cabo -salvo indicación contraria- con una densidad celular comprendida entre 5×10^3 y 2×10^4 cél./cm², tanto para células BHK₂₁, como para células Vero crecidas en cajas de Petri. En todos los casos la infección se realizó inoculando una dilución apropiada del virus (0.2 ml/cm² de superficie) e incubando dichas células durante 1 h a 37°C con agitación periódica. Transcurrido este lapso, la monocapa celular se lavó dos veces con medio de cultivo y se cubrió luego con 0.02 ml/cm² del medio de cultivo correspondiente. Las células no infectadas usadas como control en los distintos experimentos fueron tratadas de igual forma pero reemplazando la suspensión viral por medio de cultivo.

4. Cuantificación de VI.

La cuantificación de VI, mediante la medida de unidades formadoras de placas (UFP) se llevó a cabo en células Vero crecidas bajo medio sólido, siguiendo básicamente el método descrito por Mifune y col. (1971). La lectura de las placas de lisis formadas se realizó a los 4 días después de la infección para

el virus Pichinde y a los 6 días después de la infección para los virus Tacaribe y Junín.

La titulación de virus libres en los sobrenadantes celulares se realizó mediante la cuantificación de UFP en diluciones apropiadas de dichos sobrenadantes. Para la cuantificación de virus asociados a células se procedió previamente a liberar los virus asociados a las membranas celulares mediante la aplicación de tres ciclos de frío (-30°C) - calor (37°C), las cuales fueron luego titulados de igual forma que los virus libres.

5. Cuantificación de DI.

La cuantificación de partículas DI se llevó a cabo mediante el recuento de focos de interferencia generados en células Vero crecidas bajo medio sólido, siguiendo básicamente el método descrito por Popescu y Lehman-Grube (1977).

6. Cuantificación de centros infectivos.

Células Vero fueron infectadas con la m.d.i. deseada. Inmediatamente después de la infección las células se lavaron exhaustivamente (4 veces) con medio de cultivo, se cubrieron con medio fresco y se incubaron por otras 3 h. Pasado este lapso, las células se lavaron nuevamente (2 veces) con medio de cultivo y se desprendieron de la monocapa con tripsina 0.25% en PBS. Una fracción de la suspensión homogénea obtenida se utilizó para determinar la concentración de células en dicha suspensión. Del resto, se tomaron varias alícuotas diferentes, cada una con un número determinado de células y se sembraron sobre monocapas de células Vero. Después de 3 h, cuando las células sembradas se pegaron a la superficie, las monocapas celulares se cubrieron con medio sólido y se trataron de igual forma que para la cuantificación de virus infectivos (4). Las células productoras de virus (que generaron placas de lisis) se expresaron como porcentaje del total de las células sembradas en la monocapa para el ensayo.

7. Clonado de virus.

Para el clonado de los diferentes virus se prepararon diluciones apropiadas de "stocks" virales obtenidos de cerebros de ratones lactantes infectados. Cada una de estas diluciones se trató como se indicó en el punto 4. para la obtención de placas de lisis. Se escogieron las cajas de Petri que presentaban placas de lisis bien separadas (aproximadamente 1 por cada 2 cm² de superficie) y de ellas se tomaron placas aisladas mediante el uso de sacabocados (de 2 mm de diámetro) estériles. Cada una de las fosas generadas se lavó 3 veces con 15 µl de medio de cultivo y cada uno de los líquidos de lavado se mezcló con el cilindro de medio sólido correspondiente. Se homogeneizó cada preparación mediante el uso de varillas y el homogenato obtenido se utilizó para su amplificación en células BHK₂₁ (ver 10.1.)

8. Curvas de crecimiento viral.

Células Vero o BHK₂₁ crecidas en cajas de Petri de 35 mm de diámetro se infectaron con la m.d.i. deseada del virus cuyo crecimiento se deseaba analizar. A diferentes tiempos post-infección se recogieron los sobrenadantes celulares y se congelaron a -70°C hasta su titulación (4.). En el caso de ser necesario, se sembraron e infectaron células en iguales condiciones, las cuales fueron desprendidas de la monocapa y cuantificadas (por recuento en una cámara de Neubauer) a los mismos tiempos post-infección a los cuales se colectó el sobrenadante. Los resultados se expresaron, para los diferentes tiempos, en UFP/ml o UFP/cél.

9. Efecto citopático.

Células Vero crecidas en cajas de Petri de 35 mm de diámetro se infectaron, o no (controles), con la m.d.i. deseada del "stock" cuya capacidad citopatogénica se deseó evaluar. A diferentes tiempos post-infección se desprendieron las células con tripsina y se determinó por recuento en cámara de Neubauer el

número de células por caja. El resultado se expresó como porcentaje del número máximo de células (% de saturación), tanto para las células infectadas como para los controles no infectados.

10. Purificación de virus.

10.1. Obtención de "stocks" virales.

i) Amplificación. Los virus clonados en células Vero fueron amplificados en células BHK21 infectando una monocapa (aproximadamente 10^6 células) con la totalidad de los virus obtenidos de una única placa de lisis (7.). Después de 1 h de adsorción a 37°C se cubrieron las células con medio de cultivo. Día a día se recolectaron los sobrenadantes y se reemplazaron por medio de cultivo fresco. Los sobrenadantes obtenidos fueron titulados y se conservaron a -70°C hasta su utilización. De aquí en adelante la amplificación de los virus para la preparación de "stocks" difiere según la proporción de partículas DI que se desee obtener en los mismos (el fundamento de esta diferencia se discute en el Capítulo II).

a) "stocks" CPE (+) -baja proporción de DI- : Los virus clonados en células Vero, se usaron para infectar células BHK21 como se indicó más arriba. El sobrenadante del 3^{er} día post-infección (DPI) de este primer pasaje en células BHK21 se utilizó para infectar células BHK21 con m.d.i. = 0.02 UFP/cél. Diariamente se realizaron cambios de medio y se recolectaron los sobrenadantes del 3° y 4° DPI. Inmediatamente después de recolectados cada uno de los sobrenadantes se concentró como se indica más adelante (ii).

b) "stocks" CPE (-) -alta proporción de DI- : Los virus provenientes de un clon de virus Tacaribe aislado en células Vero se amplificaron con un primer pasaje en células BHK21 como se indicó antes. El sobrenadante del 5° DPI de dicho pasaje se utilizó para hacer un nuevo pasaje en células BHK21 a m.d.i. = 5. Utilizando el mismo procedimiento (infectando con el sobrenadante del 5° DPI del pasaje anterior a m.d.i. = 5) se realizaron de 1 a

3 pasajes más en células BHK21. Los sobrenadantes del 4°, 5° y 6° día del último pasaje en células BHK21 fueron recolectados y concentrados inmediatamente según se indica a continuación.

ii) Concentración viral. Los sobrenadantes de células BHK21 infectadas fueron clarificados por centrifugación a 6.000 rpm durante 30 min. a 5°C en un rotor GSA de una centrífuga Sorvall. Los sobrenadantes clarificados fueron sometidos a centrifugación durante 75 min. a 45.000 rpm y 5°C en un rotor 55.2 Ti de una ultracentrífuga Beckman L8-55. Los viriones sedimentados fueron resuspendidos (en frío) en 1/100 de su volumen original en medio de cultivo suplementado con 10% de glicerol y 20% de suero. La suspensión viral, luego de homogeneizada, se fraccionó y se conservó a -70°C o a -196°C hasta su utilización.

Observaciones: los títulos de los "stocks" CPE (+) variaron entre 1×10^8 y 1×10^9 UFP/ml con una relación de DI a UFP inferior a 10^{-4} . Por otra parte, los títulos de los "stocks" CPE (-) variaron entre 1×10^6 y 2×10^7 UFP/ml con una proporción de DI a UFP entre 0.2 y 20. Debe destacarse, además, que esta metodología tan estricta para la preparación de "stocks" comenzó a aplicarse después de analizar el comportamiento de los arnavirus en células Vero (Capítulo II). Por lo tanto, la mayor parte de los experimentos llevados a cabo en células BHK21 fueron realizados (salvo indicación contraria) con "stocks" que presentaban (según se demostró después) un comportamiento intermedio al presentado por los "stocks" CPE (+) y CPE (-) al replicar en células Vero.

10.2. Preparación de virus para la obtención de antígenos virales y como fuente de proteínas virales marcadas.

Células BHK21 se infectaron con m.d.i. = 1 del "stock" adecuado de virus Tacaribe. 24 h después de la infección se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco conteniendo 10 μ Ci/ml de 3 H-leucina, 0 10 μ Ci/ml de 35 S-metionina o 1 μ Ci/ml de 14 C-leucina (virus marcados), o sin radiactivo (virus no marcados). A las 48 HPI el sobrenadante celular se cosechó y los virus fueron

sedimentados como se indicó antes (10.1.ii). Los virus sedimentados fueron resuspendidos y purificados a través de un colchón de glicerol 30% (o de sacarosa 30%) y luego mediante un gradiente de glicerol y tartrato de sodio y potasio mediante el método descrito por Romanowski (1981).

11. Obtención de líquido ascítico de ratón hiperinmune contra virus Tacaribe (LATac).

La preparación de LATac se realizó por inmunización de 6 ratones albinos de 3 meses de vida. El plan de inmunización fue el siguiente:

- Día 0 : 1ª inoculación. 5×10^5 UFP/ratón en 0.2 ml de PBS por vía intraperitoneal.
- Día 14 : 2ª inoculación. 5×10^5 UFP/ratón en 0.2 ml de PBS-coadyuvante de Freund completo (1:1) por vía intraperitoneal.
- Día 28 : 3ª inoculación. Igual que la 2ª más 5×10^6 células de tumor ascítico de Erlich a cada ratón por vía intraperitoneal.
- Día 40 : Extracción de LATac.

Los líquidos ascíticos fueron obtenidos por punción intraperitoneal y posterior clarificación a 10.000 xg durante 30 min. Antes de ser utilizados para inmunoprecipitación o para la determinación de antígenos virales por inmunofluorescencia indirecta, se incubaron los LATac a 56°C durante 30 min.

12. Determinación de antígenos virales en células infectadas con virus Tacaribe, por el método de inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Células Vero crecidas sobre vidrios de 8 mm de diámetro en cajas de Petri de 35 mm de diámetro (5 vidrios por caja) se infectaron o no (controles) con 0.3 ml de la dilución apropiada de virus Tacaribe. A diferentes tiempos después de la infección los vidrios fueron levantados y lavados 10 veces cada uno

en PBS (por inmersión). Estos se colocaron luego en recipientes adecuados y las células se fijaron con acetona a -20°C (antígenos totales) o con una solución de paraformaldehído al 0.4% en PBS a temperatura ambiente (antígenos de superficie) durante 15 min. en ambos casos. Luego, cada vidrio se lavó por inmersión en 2 vasos con agua destilada y por último en uno con PBS (10 veces en cada uno). Se dejaron secar a temperatura ambiente, se cubrieron luego con 50 μl de una dilución 1/100 en PBS del LATac (11.) y se incubaron durante 30 min. a 37°C . Finalizada la incubación se repitieron los lavados en 3 vasos con PBS (10 veces cada uno) y se dejaron secar a temperatura ambiente. Cada uno de los vidrios se cubrió con 50 μl de una solución (1/200 en PBS) de suero anti- γ -globulina de ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína y se incubó nuevamente a 37°C durante 30 min. Se lavaron nuevamente 3 veces con PBS y se montaron sobre portaobjetos. Los preparados fueron observados en un microscopio de fluorescencia y fotografiados (cuando fue necesario) con película Kodak de 400 asa (exposición de 30 seg.). Para realizar el recuento de células inmunofluorescentes, al menos dos observadores diferentes contaron como mínimo 1.000 células totales provenientes de dos preparados independientes. Los resultados se obtuvieron promediando dichos recuentos y se expresaron como porcentaje con respecto al número total de células.

13. Determinación del efecto de la infección viral sobre la síntesis de proteínas, ADN y ARNs celulares.

Monocapas de células crecidas en cajas de Petri de 35 mm de diámetro, infectadas o no, fueron marcadas a diferentes tiempos post-infección durante 1 h con [^3H]-leucina (2 $\mu\text{Ci/ml}$), [^{35}S]-metionina (2 $\mu\text{Ci/ml}$), [^3H]-timidina (1 $\mu\text{Ci/ml}$) o [^3H]-uridina (1 $\mu\text{Ci/ml}$) en el medio de cultivo adecuado. Al finalizar el período de marcación (tiempo indicado en las tablas o gráficos), se eliminó el sobrenadante y se lavó la monocapa celular 3 veces con PBS. Las células se desprendieron con el mismo "buffer" y se transfirieron a un tubo de hemólisis, se agregó

a cada uno ácido tricloroacético (TCA) a concentración final de 10% y se incubaron a 0°C durante 30 min. El material ácido precipitable fue sedimentado a 1.600 xg durante 15 min. Una alícuota del sobrenadante se utilizó para medir la radiactividad ácido soluble. El sedimento se lavó 2 veces con ácido tricloroacético (TCA) 10% frío y luego se disolvió con 0.2 ml de Protosol® y se diluyó con 5 ml de líquido de centelleo. Se midió la radiactividad de cada muestra en un contador de centelleo líquido. Por otra parte células no marcadas, infectadas o no, se lavaron y desprendieron en idéntica forma a la indicada y se utilizaron para cuantificar ADN mediante el método fluorométrico descrito por Erwin y col., (1980). Cada una de las determinaciones (medida de radiactividad y contenido de ADN) fue realizada por duplicado. La radiactividad ácido soluble y ácido precipitable se normalizó por el contenido de ADN del cultivo y los resultados se expresaron como porcentaje respecto del control no infectado correspondiente.

14. Marcación y análisis de proteínas intracelulares mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (PAA).

Células Vero, infectadas o no, fueron preincubadas en medio de cultivo sin metionina o con el 10% de la concentración normal de glucosa durante 30 min. y marcadas luego, a diferentes tiempos post-infección, con [³⁵S]-metionina o [³H]-glucosamina, respectivamente (la actividad específica del radiactivo utilizado en cada caso se indica en la leyenda de la figura o tabla correspondiente). Al finalizar el período de marcación las células se lavaron 3 veces con PBS, se desprendieron en presencia del mismo "buffer" y fueron sedimentadas a 800 xg durante 5 min. a 5°C. Las células así obtenidas se resuspendieron en la cantidad apropiada de "buffer de muestra" (62,5 mM Tris-HCl pH=6.8, 10% de glicerol, 1% SDS y 1% de β-mercaptoetanol) y se calentaron durante 5 min. a 100°C. Las proteínas fueron analizadas en un gel desnaturalizante de PAA-SDS en gradiente de concentración 7/15% según la metodología descrita por Laemmli (1970). La electroforesis

se llevó a cabo durante 12 h a 90 voltios o durante 14 h a 80 voltios. Después de la corrida cada gel se procesó para fluorografía siguiendo el método de Bonner y Laskey (1974). Una vez procesado, cada gel se usó para impresionar una placa radiográfica Kodak XK-1 durante el período necesario (6 h a 14 días). La exposición se realizó a -70°C . En el caso de ser necesario se realizó la cuantificación de la radiactividad incorporada en proteínas específicas. Para ello, una vez revelada la placa radiográfica expuesta al gel, se utilizó para determinar por superposición la ubicación de cada una de las muestras. Se separaron las calles correspondientes a cada una de ellas y se cortaron en fracciones de 2 mm cada una a lo largo del eje mayor. Cada una de las fracciones se trató con 0.4 ml de H_2O_2 30% y se incubaron en frasco cerrado durante 16-24 h a 60°C . Una vez digeridas las muestras se disolvieron en el líquido de centelleo adecuado y se cuantificó la radiactividad incorporada en un contador de centelleo líquido. La radiactividad en cada proteína fue calculada como la incorporación en cada pico por encima del fondo basal.

Para el análisis bidimensional de proteínas, el sedimento de células marcadas obtenidas como se indicó al principio, se procesó siguiendo la metodología descrita por O'Farrell (1975). Rutinariamente se corrieron junto a las muestras a analizar marcadores de peso molecular (fosforilasa b, 94 Kd; seroalbúmina bovina, 67 Kd; ovoalbúmina, 43 Kd; anhidrasa carbónica, 30 Kd; inhibidor de tripsina, 20,1 Kd y lactoalbúmina, 14,4 Kd). Después de terminada la electroforesis, la calle donde se corrieron dichos marcadores se cortó y tiñó mediante la técnica de plata (Wilson, 1983).

15. Análisis de ARNs virales radiactivamente marcados mediante geles de poliacrilamida (PAA).

Sobrenadantes de células infectadas conteniendo viriones marcados radiactivamente en su ARN, se clarificaron a $8.000\times g$ durante 15 min. a 5°C en una centrífuga Sorvall. Los sobrena-

dantes fueron centrifugados sobre un colchón de glicerol al 30% en "buffer" Tris-HCl 20 mM pH=7.4, 1 mM EDTA a 180.000 xg durante 15 min. a 5 °C en un rotor 50 Ti de una ultracentrífuga Beckman L8-55. A partir del sedimento se extrajeron y purificaron los ARNs virales marcados mediante extracciones fenólicas, según lo describieron Perry y col. (1972) y éstos se analizaron en geles de PAA (Loening, 1967). Los geles obtenidos se cortaron en fracciones de 2 mm y se procesaron para la determinación de radiactividad en igual forma a la indicada en el punto anterior.

16. Materiales.

Todas las drogas utilizadas durante el presente trabajo fueron obtenidas de Sigma Chemical Company (St. Louis, E.E.U.U.), Merck (Darmstadt, República Federal Alemana) y Bio-Rad Laboratories (Richmond, California, E.E.U.U.). El Protosol® y los materiales radiactivos fueron obtenidos de New England Nuclear (Boston, MA, E.E.U.U.): [4,5-³H]-L-leucina (60 Ci/mmol); [³⁵S]-metionina (1400 Ci/mmol); [6-³H]-glucosamina (23 Ci/mmol); [2-¹⁴C]-uridina (50 mCi/mmol); [5,6-³H]-uridina (50 Ci/mmol); [6-³H]-timidina (15 Ci/mmol). La actinomicina D fue obtenida de Merck Sharp y Dohme, Argentina. Los medios de cultivo y sueros fueron obtenidos de Gibco Laboratories (Grand Island, New York, E.E.U.U.). El material de cultivo descartable se obtuvo de Nunc (Roskilde, Dinamarca).

RESULTADOS Y DISCUSION

CAPITULO I

A.Evaluación de parámetros de crecimiento de los arenavirus en células BHK21.

B.Efecto de la actinomicina D sobre la replicación viral.

A. EVALUACION DE PARAMETROS DE CRECIMIENTO DE LOS ARENAVIRUS EN CELULAS BHK₂₁.

Los arenavirus presentan en condiciones experimentales un amplio rango de hospedadores (ver Introducción) y son capaces de infectar una gran variedad de células animales (Hotchin, 1971; Lehman-Grube, 1971). En general, con el objeto de analizar aspectos biológicos y moleculares de la replicación de los arenavirus han sido utilizadas preferentemente células BHK₂₁ y Vero. En menor medida se han empleado otras líneas celulares, como por ejemplo células L, MDCK, MDBK, HeLa, PK-15 y PK-13.

Durante la replicación viral en general, puede observarse que, independientemente del tiempo necesario para alcanzar el título máximo (menor de 30 min. para muchos bacteriofagos y mayor de 30 h para poliovirus y leucovirus), la forma de las curvas de crecimiento para los diferentes virus es coincidente. De acuerdo a la variación de la concentración de virus infectivos en los sobrenadantes celulares después de la infección, pueden distinguirse durante el ciclo replicativo las siguientes etapas: adsorción viral, período de latencia, fase logarítmica de crecimiento y fase estacionaria de crecimiento viral. A continuación se analizan cada una de estas etapas por separado.

1) Adsorción.

Es bien sabido que el proceso de adsorción viral sigue una cinética de primer orden (Horzinek, 1975) siendo la velocidad de adsorción directamente proporcional a la superficie a la cual el virus puede adsorverse, es decir, a la concentración celular. Esta cinética puede describirse según la relación:

$$\frac{V_t}{V_0} = e^{-k \cdot t \cdot c.}$$

donde V_0 y V_t representan la concentración de virus libre a tiempo cero y después de t min., respectivamente; c es la concentración celular; e la base de los logaritmos neperianos y k la constante de adsorción. En nuestras condiciones experimenta-

les, la adsorción de virus Tacaribe, tanto en células BHK21, como en células Vero, presentó una constante de adsorción de aproximadamente $3 \times 10^{-8} \text{ ml.cel}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

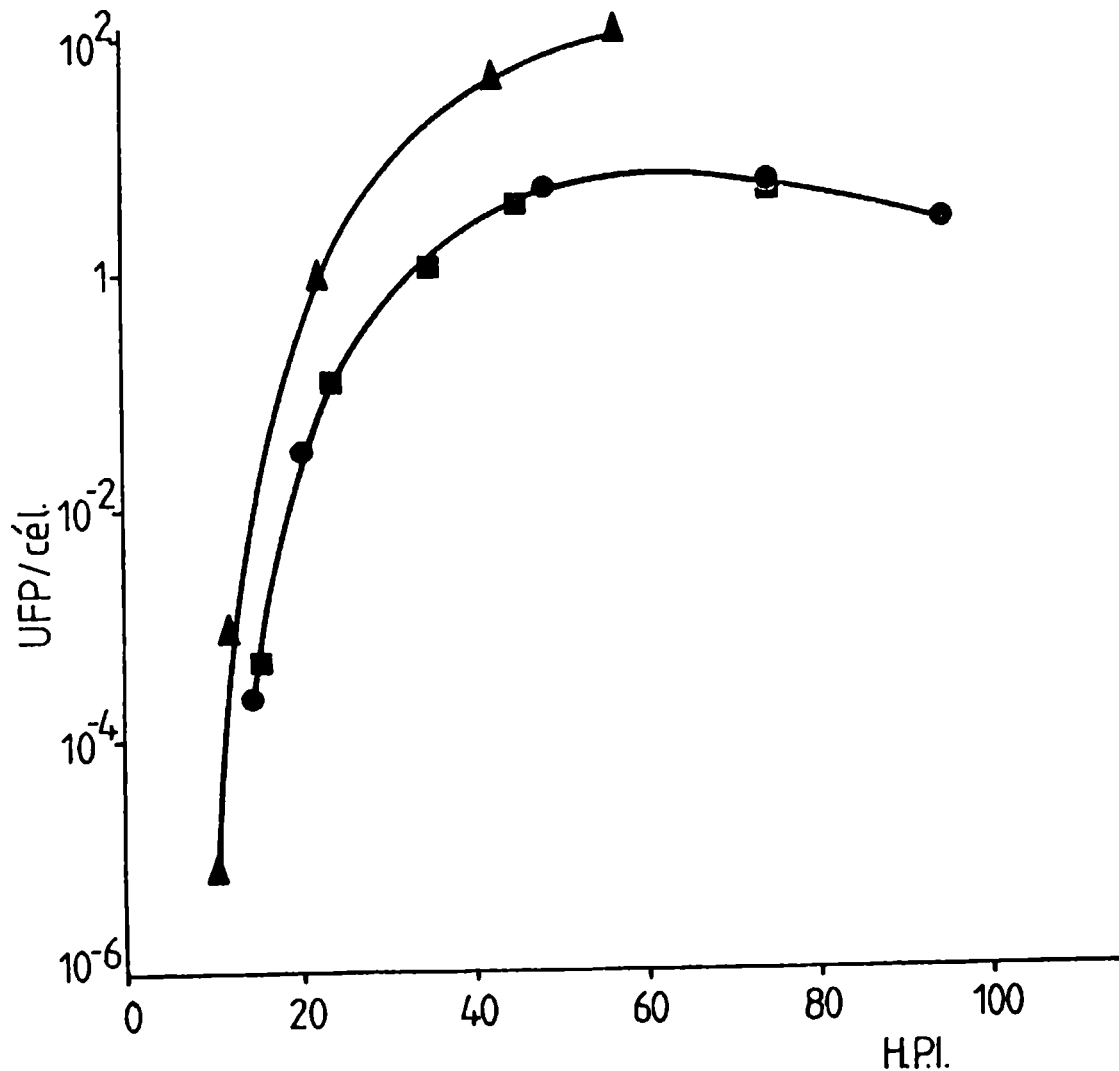
2) Período de latencia.

Después de la adsorción viral se observa un período en el cual es imposible detectar virus libre en los sobrenadantes celulares. La figura I.1 muestra las curvas de crecimiento de tres miembros de la familia Arenaviridae: los virus Junín, Tacaribe y Pichinde. Cada una de las curvas representa la producción de virus infectivos en función del tiempo, después de la infección de células BHK21 con una m.d.i. = 1, para cada uno de los virus mencionados. Puede verse claramente que el período de latencia para cada uno de ellos es de aproximadamente 8 h. Este parámetro ha sido ampliamente estudiado para diferentes arenavirus, observándose que dicho período no supera las 8 HPI (Coto y Vombergar, 1969; Mifune y col., 1971; Rawls y col., 1976; Saleh y col., 1979).

3) Fases logarítmica y estacionaria de crecimiento viral.

Debido a la estrecha relación existente entre ambas etapas, estas serán estudiadas en conjunto. Para los tres virus analizados se observa un rápido aumento de la producción viral durante la fase logarítmica de crecimiento. Sin embargo, como se muestra en la figura I.1, a medida que transcurre el tiempo después de la infección, el aumento de la cantidad de virus en el sobrenadante es cada vez menor. Se llega así al título máximo en la curva de crecimiento viral, a partir del cual comienza la fase estacionaria. Como se mencionó en la Introducción, el mecanismo molecular que lleva al establecimiento de esta fase y la posterior disminución en la producción viral está aún en discusión. Retomando el análisis de la figura I.1, puede observarse que el máximo en la curva de crecimiento se alcanza al mismo tiempo para los tres arenavirus estudiados (48 HPI a m.d.i.=1). Sin embargo, la producción máxima de virus Pichinde (de aproximadamente 200 UFP/célula) es unas 20 veces superior a la que presen-

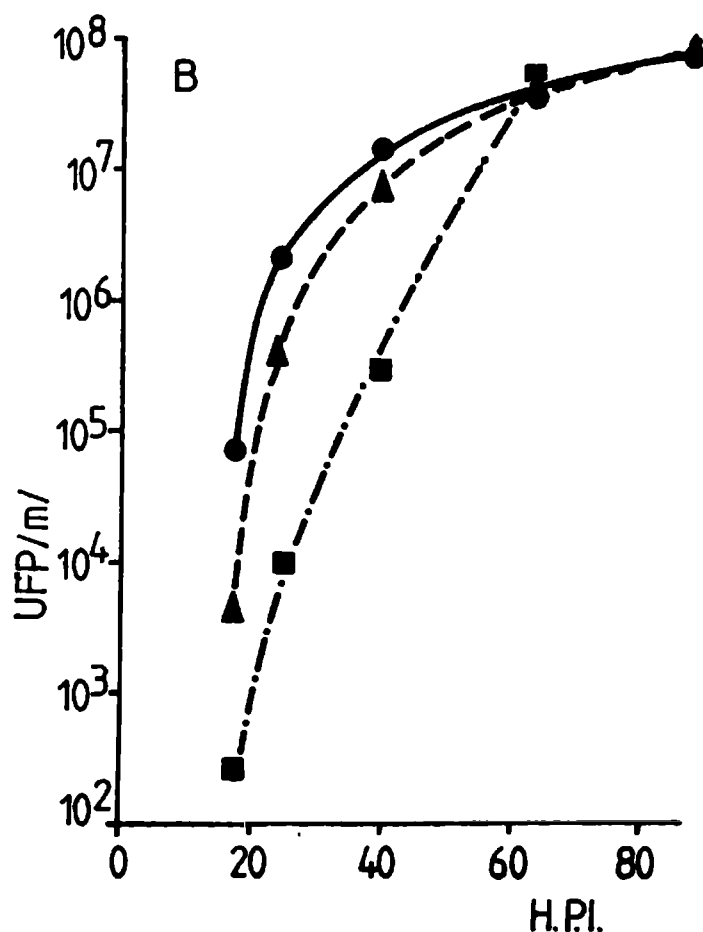
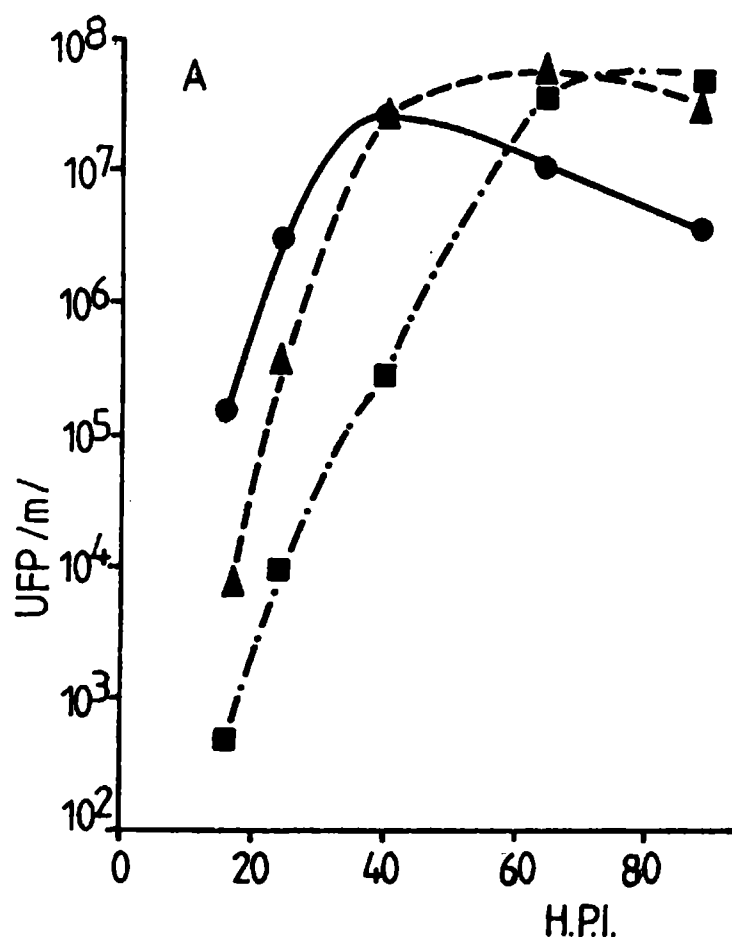
Figura 1.1. CURVAS DE CRECIMIENTO DE LOS VIRUS PICHINDE, TACARIBE Y JUNIN EN CELULAS BHK₂₁. Células BHK₂₁ fueron infectadas con m.d.i. = 1 UFP/cél. con los virus Pichinde (▲), Tacaribe (●) y Junín (■). Una fracción de células infectadas se utilizó para analizar la producción viral. Para ello, a los tiempos indicados se recolectaron los sobrenadantes celulares y fueron reemplazados por medio de cultivo fresco. En cada uno de estos sobrenadantes se determinó la producción viral por plaqueo en células Vero (Materiales y Métodos -4-). Otra fracción de células infectadas se usó para evaluar el número de células en la monocapa. Para ello, a distintos tiempos post-infección se desprendieron las células de la monocapa y se realizó el recuento como se indicó en Materiales y Métodos -2-. Ambos resultados se utilizaron para expresar la producción viral en UFP/cél.



tan los virus Tacaribe y Junín. No han sido investigadas hasta el momento las causas que provocan este hecho. Consideramos, por lo tanto, interesante profundizar en el estudio de estos dos aspectos: a) el establecimiento de la fase estacionaria y b) la diferencia en los títulos máximos para los diferentes arenavirus.

a) Establecimiento de la fase estacionaria. Posible participación de las partículas DI. Como se señaló antes (ver Introducción), el mecanismo molecular que lleva al establecimiento de la fase estacionaria en los arenavirus y la posterior disminución en la producción viral es aún desconocido. Existen, sin embargo, dos hipótesis al respecto: una de ellas, sustentada por Dimock y col. (1982), sugiere un proceso de autorregulación de los VI; la otra, enunciada por Dutko y Pfau (1978), propone una regulación mediada por partículas DI. Como se mostrará en el Capítulo II, hemos desarrollado condiciones en las cuales pueden obtenerse "stocks" virales con una proporción definida de partículas DI a VI. Este hecho nos permitió analizar la posible participación de las DI en el desarrollo de las curvas de crecimiento viral. La figura I.2.A. muestra las curvas de crecimiento obtenidas al infectar células BHK₂₁ a distintas multiplicidades con un "stock" que posee una relación de DI a UFP de 1,2. Puede observarse, en primer lugar, una clara dependencia de la velocidad inicial de crecimiento con la m.d.i. utilizada. La misma dependencia con la m.d.i. se observa en la aparición del máximo título viral y consecuentemente en el momento en el cual se establece la fase estacionaria después de la infección; mientras que a m.d.i. = 5 el máximo aparece a las 40 HPI, a m.d.i. = 0.01 se observa recién después de las 60 HPI. Una observación interesante resulta la caída de los títulos virales después de la obtención del máximo. Esta caída es rápida a m.d.i. elevada. La infección con una m.d.i. intermedia (m.d.i. = 0.5) produce un comportamiento intermedio. En la figura I.2.B., por otra parte, se muestran las curvas de crecimiento, a distintas m.d.i., de un "stock" de virus Tacaribe que contiene una muy baja proporción

Figura 1.2. EFECTO DE LA PROPORCION DE PARTICULAS DI EN EL MOMENTO DE LA INFECCION SOBRE EL CRECIMIENTO DE VIRUS TACARIBE EN CELULAS BHK₂₁. Células BHK₂₁ fueron infectadas con diferentes "stocks" de virus Tacaribe a m.d.i. = 5 (●), 0.5 (▲) y 0.01 (■) UFP/cél. A los tiempos indicados los sobrenadantes celulares fueron recolectados y las células se cubrieron con medio de cultivo fresco. En cada uno de los sobrenadantes se determinó la concentración de partículas infectivas por el método de plaqueo en células Vero (Materiales y Métodos, 4.). A. Células BHK₂₁ infectadas con un "stock" de virus Tacaribe con una relación de DI/VI = 0.0001. B. Células BHK₂₁ infectadas con un "stock" de virus Tacaribe con una relación de DI/VI = 1.2.



de DI a VI (menor a 10^{-4}). Puede observarse en este caso, la misma dependencia de la velocidad de crecimiento inicial con la m.d.i. que la observada en el caso anterior. Sin embargo, a diferencia de lo encontrado en una infección con una elevada proporción de DI a VI (Fig. I.2.A.), y, a pesar de observar una tendencia al establecimiento de la fase estacionaria a m.d.i. elevadas (> 0.5), no se produce en ningún momento la caída del título viral. A m.d.i. bajas las curvas de crecimiento viral parecen no ser afectadas por la presencia de DI. Estas observaciones resultan coherentes con la incapacidad de las DI para autorreplicarse (aún no demostrada para arenavirus); si estas fueran incapaces de replicar en ausencia de VI, en una infección con baja m.d.i. -donde la probabilidad de coinfección de células con VI y DI es baja- deberían producirse preferentemente VI. No debería por lo tanto, esperarse un comportamiento muy diferente entre las curvas de crecimiento a m.d.i. baja para infecciones con distintas proporciones de DI. A m.d.i. elevadas, sin embargo, se favorecería la coinfección de las células por DI y VI, lográndose la replicación de ambas. Los resultados aquí presentados sugieren que las DI están involucradas en los mecanismos que llevan al establecimiento de la fase estacionaria y a la disminución posterior en la producción viral. Esto apoya la hipótesis presentada por Dutko y Pfau acerca de la participación de las DI en la regulación de la producción de VI.

b) Análisis de la diferencia en los títulos máximos para los diferentes arenavirus. Como se comentó más arriba, la infección de células BHK₂₁ con distintos arenavirus a m.d.i. = 1, produce una diferencia importante en cuanto a los títulos máximos obtenidos. Recordemos que el virus Pichinde presenta un título máximo 20 veces superior al que presentan los virus Junín y Tacaribe. Este comportamiento podría ser el resultado de dos fenómenos totalmente diferentes: o bien podría representar un mayor nivel de síntesis de partículas virales completas o específicamente de su material genético (responsable de la infectividad) en

el caso de virus Pichinde, o bien, podría representar una mayor infectividad específica por parte del virus Pichinde, es decir, que durante su replicación este virus produciría la misma cantidad de material genético que los virus Tacaribe y Junín, pero el primero infectaría en forma más eficiente. No obstante, no debe descartarse la posibilidad de que ambos fenómenos contribuyan para producir la diferencia observada. Con el fin de atacar este problema, se decidió medir la infectividad específica, es decir, la capacidad infectiva (UFP) de los viriones por unidad de masa del genoma viral. Debido a la dificultad que representa obtener una cantidad apreciable de virus para cuantificar la masa de su material genético por los métodos convencionales, decidimos utilizar un método indirecto para evaluar dicha masa. Para ello, se diseñó el siguiente experimento: células BHK21 fueron infectadas (por separado) con m.d.i. = 1 con los virus Junín, Tacaribe y Pichinde. Inmediatamente después de la infección, las células fueron marcadas con [^{14}C]-uridina hasta que la radiactividad específica del ARN celular (dpm/ μg de ARN) se mantuvo constante. Esto se logró después de 24 h de marcación. A las 48 HPI -cuando se estableció la fase estacionaria de crecimiento viral- se renovó el medio radiactivo y se recogieron los virus marcados liberados al medio extracelular durante un período de 4 h. Pasado este lapso se recuperó el sobrenadante y se repitió la operación durante 4 h más. Al final de este período se recuperó el sobrenadante y se levantaron las células de la monocapa. Se purificaron los viriones de cada sobrenadante y se evaluó, por un lado, su capacidad infectiva, y por el otro, la radiactividad incorporada al ARN viral. Por otra parte se determinó la actividad específica ([^{14}C] dpm/ μg de ARN) del ARN celular. Este último dato se utilizó para estimar la masa del ARN viral producido, a partir de la incorporación de ^{14}C en los ARNs para cada uno de los arenavirus. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla I.1.

Tabla 1.1. DETERMINACION DE LA INFECTIVIDAD ESPECIFICA DE LOS VIRUS PICHINDE, TACARIBE Y JUNIN.

Virus	Masa de ARN viral ⁺ ($\mu\text{g/h} \times 10^3 \text{ cél.}$)	Infectividad específica ⁺ (UFP/ μg v-ARN)	Fracción de virus infectivos ⁺
Pichinde	11,0	1×10^3	$5,5 \times 10^{-3}$
Tacaribe	9,0	5×10^7	$2,7 \times 10^{-4}$
Junin	8,6	6×10^7	$3,3 \times 10^{-4}$

Monocapas de células BH₂₁ fueron infectadas a m.d.i. = 1, con virus Pichinde, Junin o Tacaribe. Después de los lavados correspondientes, las células fueron cubiertas con medio de cultivo suplementado con 0.05 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^{14}C -uridina y 2 μM total de uridina. Cada 12 h el medio de cultivo fue renovado por medio fresco conteniendo igual actividad específica del precursor radiactivo. A las 48 HPI (cuando en los tres casos se alcanzó la fase estacionaria) se lavaron las monocapas 2 veces con PBS y se repitió el cambio de medio. 4 h después se repitió nuevamente el procedimiento, conservando el sobrenadante obtenido. A las 4 h se colectó el nuevo sobrenadante y se levantaron las células de la monocapa celular. Cada una de las muestras se procesó de la siguiente forma: los sobrenadantes celulares se dividieron cada uno en dos alícuotas; una de ellas se utilizó para cuantificar VI y la otra se utilizó para purificar el ARN viral y analizar la incorporación de ^{14}C en dicho ARN, como se indicó en Materiales y Métodos (15.). Por otra parte, los ARNs celulares totales se purificaron mediante el método descrito por Perry y col. (1972) y se determinó su actividad específica cuantificando la masa de ARN mediante el método de Fleck y Munro (1962) y la radiactividad incorporada como se indica en el punto 13. de Materiales y Métodos. Con el valor de la actividad específica del ARN celular, y asumiendo que es idéntico al del ARN viral, se calculó la masa de ARN viral producido cada 4 h en base al dato de incorporación de ^{14}C en dicho ARN. Por otra parte, conociendo la producción de virus infectivos en cada lapso, se calculó la infectividad específica y se expresó como UFP/ μg ARN viral. Los resultados son el promedio de las determinaciones realizadas sobre los sobrenadantes colectados en los dos periodos consecutivos de 4 h cada uno.

Para la estimación de la masa de los ARNs virales se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones:

- 1) El "pool" nuclear de uridina es igual al "pool" citoplasmático y ambos se equilibran en unos 30 min. (Faikenthal y Lengyel, 1981).
- 2) La proporción de ARNs genómicos virales a ARNs ribosomales virales es aproximadamente la misma cuando se marca con ^3H -uridina o con ^{32}P d_4 -3. Esto significa que el contenido en uridina es similar para ambos tipos de ARN.
- 3) El ARN ribosomal constituye aproximadamente el 80% del ARN celular total.
- 4) Se supone que el contenido en uridina es similar para los tres arenavirus estudiados. Apoya esta suposición el hecho de haber encontrado un contenido en uridina muy similar para el ARN S de los virus Pichinde y Tacaribe (el virus Junin aún no ha sido secuenciado).

En base a estas consideraciones no se comete un error apreciable al suponer iguales las actividades específicas del ARN del virión y del ARN celular total.

Puede observarse que la cantidad de material genético liberado al medio extracelular es similar para los tres arenavirus. Sin embargo, la infectividad específica de virus Pichinde es aproximadamente unas 20 veces superior a la que presentan los virus Junín y Tacaribe. Este resultado permite asignar a este hecho las diferencias observadas en los títulos máximos obtenidos en las curvas de crecimiento viral (Figura I.1.). Esta mayor infectividad observada para el virus Pichinde podría asignarse a varias causas; por ejemplo: 1) podría representar un empaquetamiento más eficiente del ARN de este virus, respecto del de los virus Tacaribe y Junín, o 2) podría ser causado por una mayor estabilidad del ARN genómico del primero frente a diferentes condiciones del medio (pH, temperatura, acción de nucleasas, etc.), o 3) podría indicar una mayor eficiencia de infección del virus Pichinde frente a las células usadas para medir la infectividad. Por último, el análisis de la fracción de partículas infectivas con respecto al número total de partículas que contienen ARN viral (debido a la metodología empleada no se detectan partículas vacías) muestra que los arenavirus constituyen un ejemplo intermedio en cuanto a la fracción de partículas infectivas observadas para diferentes virus animales, cuyo límite varía entre 10^{-1} y 10^{-6} (ver Introducción).

4. Determinación del tiempo de generación viral en la fase estacionaria de crecimiento.

El tiempo necesario para que un arenavirus sintetice sus macromoléculas constitutivas, se ensamble y salga al medio extracelular, constituye un parámetro importante para acotar temporalmente los eventos moleculares que ocurren durante la replicación viral. Como se describió antes, este tiempo ha sido repetidamente verificado en la primera etapa del ciclo replicativo de varios arenavirus (período de latencia). Sin embargo, el tiempo necesario para la generación de una partícula viral en etapas posteriores del ciclo de crecimiento puede ser diferente del necesario durante el período de latencia. En este primer período, el virus

debe comenzar a sintetizar sus componentes funcionales y constitutivos y tal vez adaptar la maquinaria biosintética celular, mientras que en etapas posteriores el virus podría disponer de un "pool" de componentes virales, dependiendo entonces el tiempo de generación viral, del proceso cuya velocidad sea limitante (por ejemplo: síntesis del ARN viral, salida de la célula por brotación, etc.). Sin embargo, podría ocurrir también, que la velocidad con que se desarrolla la etapa limitante fuera mucho menor que el resto de los procesos necesarios para la neoformación viral; de esta forma no debería haber diferencia en el tiempo de generación en diferentes estadios de su ciclo replicativo. Por último, el mismo hecho de que los arenavirus alcancen la fase estacionaria de crecimiento podría -entre otras posibilidades- ser el reflejo de una disminución en la velocidad de algunas -o todas- las etapas involucradas en la generación de una partícula viral completa.

El tiempo de generación viral durante el período de latencia ha sido determinado mediante la detección en el sobrenadante celular de las primeras partículas virales infectivas. Sin embargo, el tiempo de generación en etapas posteriores del ciclo de crecimiento viral, no puede ser evaluado mediante la determinación de la producción de viriones infectivos, sino que debe recurrirse a una metodología más complicada. Por ejemplo, puede evaluarse este parámetro midiendo el tiempo transcurrido entre el agregado de un precursor radiactivo del ARN viral ([³H]-uridina) a las células infectadas y la aparición en el sobrenadante de las primeras partículas virales con su ARN homogéneamente marcado con [³H]. Con el objeto de normalizar la incorporación de [³H]-uridina se decidió marcar previamente el ARN viral con [¹⁴C]-uridina hasta alcanzar una actividad específica constante en dicho ácido nucleico y recién después se marcó con [³H]-uridina. El [¹⁴C] incorporado al ARN viral se usó como estimación de la cantidad total de ARN en los viriones producidos y fue utilizado para normalizar la cantidad de [³H]-uridina incorporada

a diferentes tiempos después de la adición de este último precursor.

Más detalladamente, el experimento se llevó a cabo de la siguiente manera: monocapas de células BHK₂₁ infectadas con virus Tacaribe se marcaron con [¹⁴C]-uridina hasta que la actividad específica del ARN celular total permaneció constante después de sucesivos cambios de medio conteniendo el mencionado precursor radiactivo. Esto se logró aproximadamente a las 24h después de comenzada la marcación. A las 48 HPI, cuando la producción viral alcanza la fase estacionaria -ver Fig. I.1.-, el medio de cultivo fue descartado y reemplazado por medio fresco conteniendo [¹⁴C]-uridina y [³H]-uridina. Este fue designado como tiempo cero del experimento. El medio de cultivo fue colectado cada 4 h y reemplazado por medio fresco conteniendo ambos precursores radioactivos. Los virus liberados al medio extracelular fueron sedimentados y su ARN purificado fue analizado mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (Fig. I.3.A.). Se estimó la radiactividad correspondiente al [³H] y [¹⁴C] incorporados a picos de ARN viral y se utilizó la marca de [¹⁴C] para normalizar la incorporación de [³H]-uridina. La figura I.3.B. muestra la acumulación normalizada de [³H]-uridina al ARN viral en función del tiempo de marcación. Puede verse que la extrapolación de la porción lineal de la curva intersecta al eje del tiempo en aproximadamente 5 h. Este es el tiempo en el cual los virus liberados al medio extracelular alcanzaron una relación ($[^3\text{H}]/[^{14}\text{C}]$) constante en sus ARNs, es decir, el tiempo en el cual aparece la primera partícula viral con su ARN homogéneamente marcado en [³H] y [¹⁴C]. Este tiempo incluye el período necesario para que la [³H]-uridina se equilibre con el "pool" de ribonucleósidos trifosfato precursores y el tiempo requerido para la replicación del ARN viral, su ensamblaje y liberación al medio extracelular formando la partícula viral completa. Este tiempo, incluye además, el tiempo necesario para la equilibración de las nucleocápsides marcadas con [³H] y [¹⁴C], con las nucleocápsides premarcadas con [¹⁴C]. De esta forma, el tiempo transcu-

Figura 1.3. DETERMINACION DEL TIEMPO DE GENERACION VIRAL PARA EL VIRUS TACARIBE. Monocapas de células BHK₂₁, crecidas en 3 cajas de Petri de 90 mm de diámetro fueron infectadas a m.d.i. = 1 con virus Tacaribe. Después de la infección, las monocapas lavadas se cubrieron con medio de cultivo suplementado con 0.05 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ de [^{14}C]-uridina y 2 μM total de uridina. Se repitieron los cambios de medio con el precursor radiactivo cada 12 h. La actividad específica del ARN celular se mantuvo constante a partir del segundo cambio. A las 48 hPI el medio de cultivo fue reemplazado por medio de cultivo fresco conteniendo 0.05 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ de [^{14}C]-uridina, 20 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ de [^3H]-uridina y 2 μM total de uridina. Este fue considerado el tiempo cero del experimento. Los fluidos sobrenadantes fueron colectados cada 4 h y reemplazados por medio fresco conteniendo ambos precursores marcados y 2 μM de uridina. Los sobrenadantes recogidos a los distintos tiempos se procesaron para purificar los ARNs virales, los cuales fueron analizados en geles de poliacrilamida (Materiales y Métodos, 15.). La radiactividad de [^{14}C] incorporada fue utilizada para normalizar la incorporación de [^3H] en los ARNs virales para los diferentes periodos (A). La acumulación de la incorporación de [^3H]-uridina (normalizada en [^{14}C]) en los picos L y S del ARN viral en función del tiempo después del agregado de la [^3H]-uridina al medio de cultivo, se utilizó para estimar el tiempo de generación viral (B).

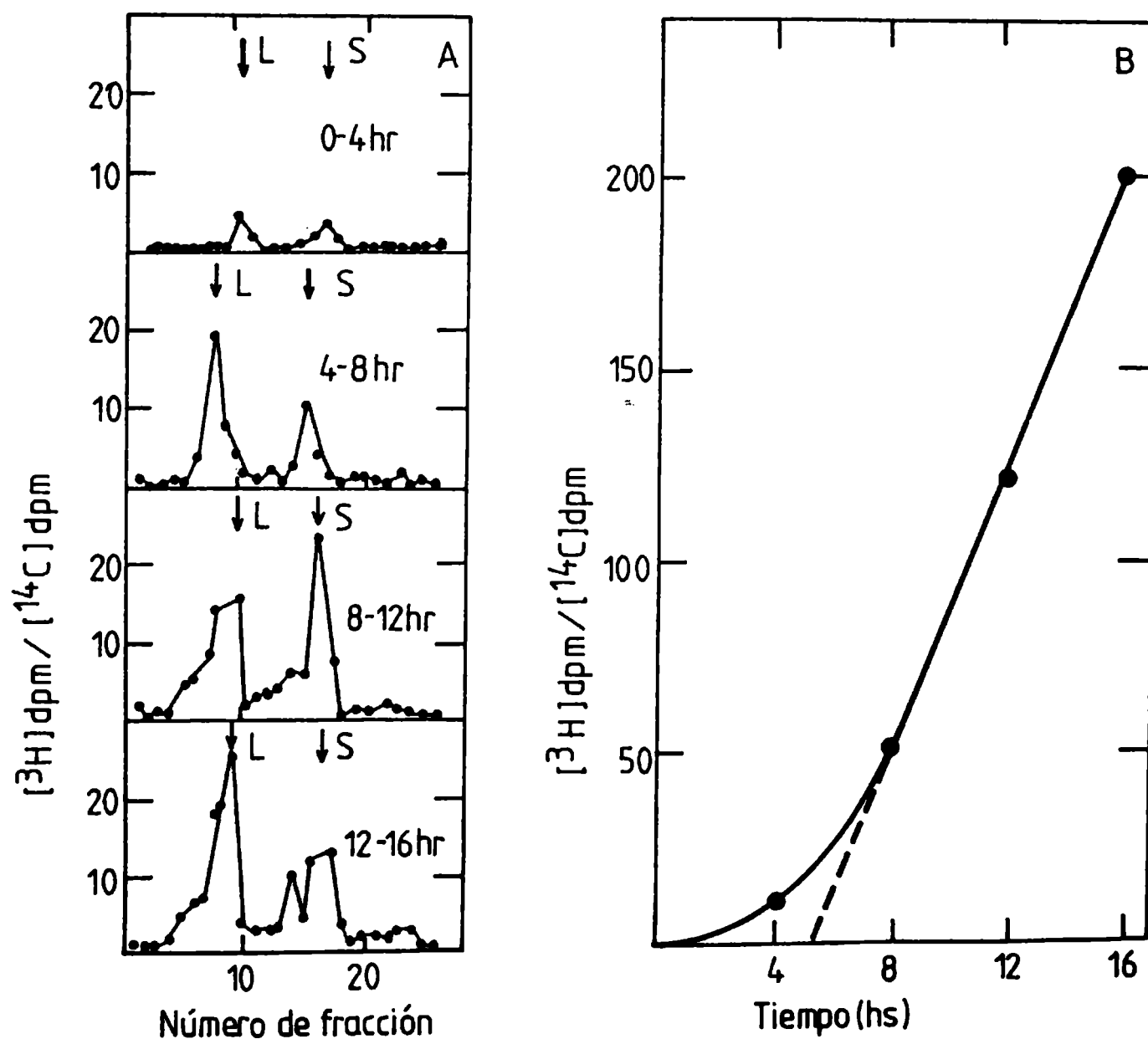
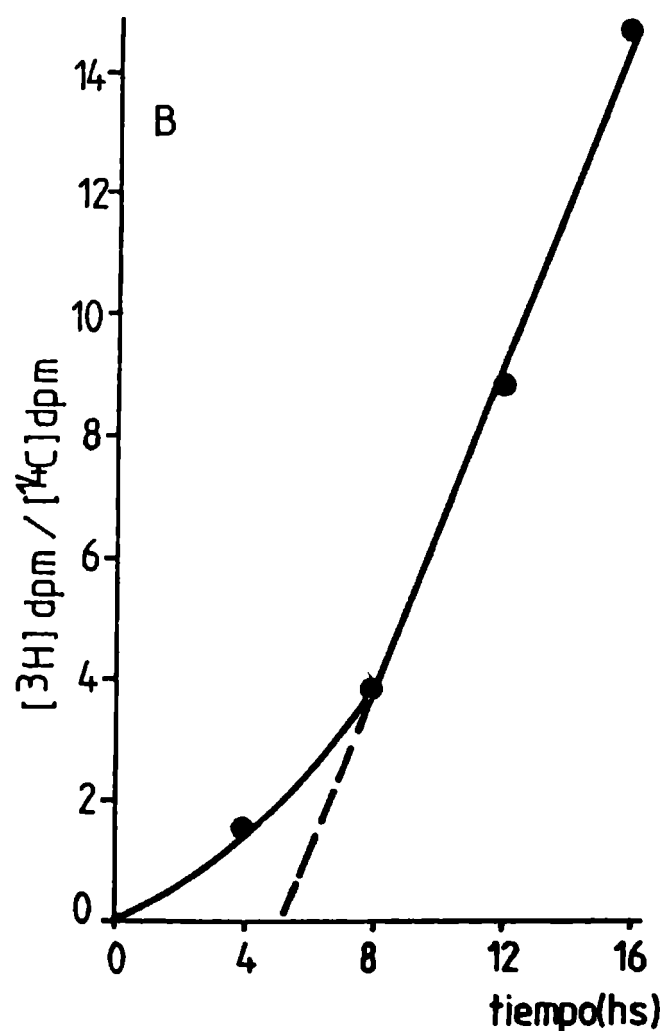
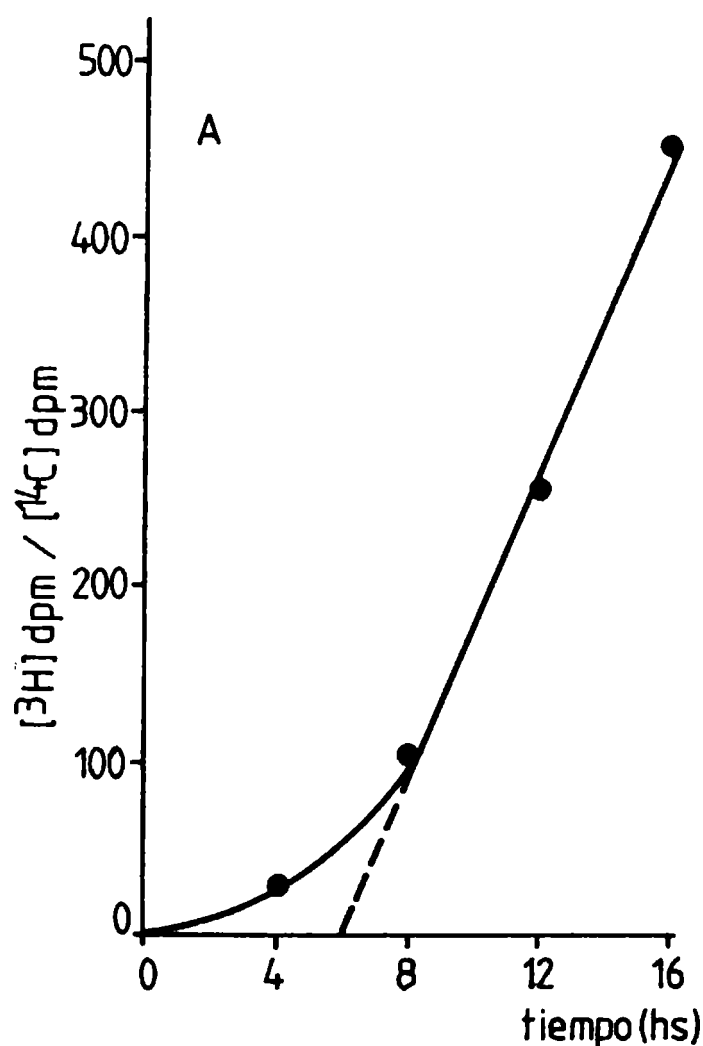


Figura 1.4. DETERMINACION DEL TIEMPO DE GENERACION VIRAL PARA LOS VIRUS PICHINDE Y JUNIN. Las condiciones experimentales para la evaluación de este parámetro en la fase estacionaria de crecimiento de los virus Junin y Pichinde fueron idénticas a las usadas para virus Tacaribe (Fig. 1.3), a excepción de las actividades específicas utilizadas; estas fueron para la determinación en virus Junin de 0.1 $\mu\text{Ci/ml}$ de $[^{14}\text{C}]$ -uridina y 10 $\mu\text{Ci/ml}$ de $[^3\text{H}]$ -uridina, y para la determinación en virus Pichinde de 0.02 $\mu\text{Ci/ml}$ de $[^{14}\text{C}]$ -uridina y 20 $\mu\text{Ci/ml}$ de $[^3\text{H}]$ -uridina. Se muestra la acumulación de la incorporación de $[^3\text{H}]$ -uridina (normalizada en $[^{14}\text{C}]$) en función del tiempo después de agregada la $[^3\text{H}]$ -uridina al medio de cultivo para los virus Pichinde (A) y Junin (B).



rrido entre el agregado de [^3H]-uridina y la acumulación lineal de [^3H] al ARN viral en el medio extracelular es una sobreestimación del tiempo de generación viral. Experimentos similares llevados a cabo en células BHK₂₁ infectadas con virus Pichinde (Fig. I.4.A.) y Junín (Fig. I.4.B.) proveyeron datos máximos para el tiempo de generación viral de 6 h y 5 h respectivamente. La evaluación de estos parámetros constituye un dato importante para la descripción del ciclo replicativo de los arenavirus y resulta, además, una herramienta básica para obtener mayor información sobre el presente sistema. En lo que sigue, se mostrará cómo se utilizó este dato para estudiar el efecto de la AMD sobre la replicación viral.

B. EFECTO DE LA ACTINOMICINA D (AMD) SOBRE LA REPLICACION VIRAL.

Con el objeto de analizar la interacción virus-célula en el presente sistema se decidió estudiar la participación de la transcripción celular durante la replicación de los arenavirus en células BHK₂₁. La AMD ha sido ampliamente utilizada para estudiar la participación nuclear y los requerimientos de ADN celular funcional durante la replicación de varios virus con genoma a ARN (ver revisión en Reich y Goldberg, 1964). Por otra parte, un análisis similar permitió establecer la necesidad de la transcripción del ADN celular durante la fase temprana de la replicación del virus influenza (Stephenson y Dimock, 1975).

Estudios llevados a cabo con virus LCM y Pichinde en células L y BHK₂₁ mostraron que la inhibición de la transcripción de las células hospedadoras por la AMD, afectaba drásticamente la producción viral determinada a 24-96 HPI (Buck y Pfau, 1969; Mifune y col., 1971; Rawls y col., 1976; Stanwick y Kirk, 1971). Se ha observado, además, que el grado de inhibición de la producción de virus Pichinde en células BHK₂₁ disminuye a medida que el tiempo que media entre la infección y el agregado de AMD al sistema aumenta (Rawls y col., 1976).

La disminución de la producción de virus Pichinde y LCM por AMD y la falta de acción de los inhibidores de la síntesis de ADN sobre la replicación viral (Mifune y col., 1971) sugirieron que sólo la transcripción del ADN celular y no su replicación, estaba implicada en alguna etapa del ciclo replicativo de los arenavirus (Buck y Pfau, 1969; Mifune y col., 1971; Pederesen, 1979).

Existen varios mecanismos posibles que permiten explicar el efecto de la AMD sobre la multiplicación de los arenavirus. Por ej., el hecho de que la máxima inhibición sobre la producción viral sea observada cuando la droga se agrega inmediatamente después de la adsorción viral, podría sugerir la necesidad de la transcripción del ADN de la célula hospedadora durante una fase temprana de la replicación viral. Alternativamente, como las células que fueron tratadas con AMD inmediatamente después de la infección han sido expuestas a la acción del inhibidor por períodos más largos que aquellas a las que se agregó AMD a tiempos más tardíos después de la infección (Rawls y col., 1976), la inhibición de la producción viral podría explicarse por la depleción de componentes celulares (de vida media relativamente larga) que podrían estar específicamente relacionados con la replicación viral. Por otra parte, debe considerarse la posibilidad de que un efecto tóxico de la droga pudiera ser causante de la inhabilidad de las células hospedadoras para sostener la replicación viral. A este respecto, debe mencionarse que las células BHK21 son sumamente sensibles a la AMD (Rawls y col., 1976; Stanwick y Kirk, 1971 y nuestras propias observaciones) y que bajo condiciones en las cuales la AMD inhibió la producción viral, también se produjo una gran disminución en el número de células de la monocapa (Rawls y col., 1976). Con el objeto de evitar los posibles efectos tóxicos de la AMD, decidimos analizar el efecto de esta droga sobre la replicación viral incubando las células durante el menor tiempo posible en presencia del inhibidor. Los estudios fueron realizados con tres miembros de la familia Arenaviridae -los virus Junín, Pichin-

de y Tacaribe- en dos etapas definidas de su ciclo replicativo: inmediatamente después de la adsorción viral y durante la fase estacionaria del crecimiento viral. El período mínimo de exposición a la droga debía asegurar la formación de las partículas virales completas y su salida al medio extracelular en presencia de AMD. Por ello, en aquellos experimentos donde el efecto del inhibidor se estudió inmediatamente después de la adsorción viral, el tiempo mínimo de exposición a la droga fue igual al período de latencia (8 h según lo que se mostró antes). En aquellos experimentos donde el efecto de la AMD se estudió en la fase estacionaria del crecimiento viral, el período mínimo de exposición a la droga fue el correspondiente al tiempo de generación viral (no mayor a 6 h, según se vio en el punto anterior). La concentración de AMD utilizada durante esta determinación fue de 2 µg/ml. Esta concentración de AMD es la que se ha utilizado más frecuentemente en el estudio de la participación de funciones celulares durante la replicación de numerosos virus (Reich y Goldberg, 1964). En nuestras condiciones experimentales dicha concentración inhibió, por lo menos, el 98% de la transcripción celular. Siguiendo estos lineamientos básicos, se infectaron células BHK21 con cada uno de los 3 arnavirus escogidos e inmediatamente después de la infección o en la fase estacionaria del crecimiento viral, se agregó la concentración establecida de AMD. Estas células se preincubaron por períodos tales que permitieran la generación y salida al medio extracelular de las partículas virales, en presencia de la droga. Al cabo de este tiempo el medio extracelular fue reemplazado por medio fresco conteniendo la misma concentración de AMD. Este último se recolectó 2-3 h después y en él se determinó la cantidad de virus infectivos liberados al medio extracelular. Como control se usaron células BHK21 infectadas y sometidas a los mismos cambios de medio, pero en ausencia de AMD. En cada uno de los casos se determinó el número de células y los resultados se expresaron en UFP/célula. La Tabla I.2. muestra el análisis estadístico de los datos obtenidos para los virus Junín, Tacaribe

Tabla 1.2: EFECTO DE LA ACTINOMICINA D SOBRE LA REPLICACION DE ARENAVIRUS EN CELULAS BHK₂₁.⁺

Virus	m.d.i. (UFP/cél)	Preincubación con AMD (HPI)	Recolección de virus (HPI)	Producción viral [#] (% del control)
Pichinde	5 - 10	0 - 9	9 - 11	101 ± 27 (7)
	1	45 - 51	51 - 54	102 ± 23 (6)
Tacaribe	5 - 10	0 - 10	10 - 12	85 ± 36 (3)
	1	38 - 44	44 - 47	98 ± 33 (4)
Junín	1	48 - 54	54 - 57	105 ± 28 (3)

⁺ Células BHK₂₁ crecidas en cajas de Petri de 35 mm de diámetro fueron infectadas con m.d.i. = 10 para la determinación del efecto de la droga a tiempos cortos después de la infección o con m.d.i. = 1 para su determinación en la fase estacionaria de crecimiento. Una parte de las células infectadas se expuso a medio de cultivo conteniendo 2 µg/ml de AMD durante 10 h (inmediatamente después de la infección) o 6 h (en la fase estacionaria de crecimiento). Con el objeto de eliminar los virus no adsorbidos durante la infección, las células donde el inhibidor se agregó inmediatamente después de la infección fueron lavadas con PBS cada 2 h y luego cubiertas con medio fresco conteniendo AMD. Las células usadas como control fueron sometidas a idénticos lavados y cambios de medio pero en ausencia del inhibidor. Después del pretratamiento con AMD, se descartaron los sobrenadantes y las monocapas celulares se lavaron 3 veces con PBS y se cubrieron con medio de cultivo fresco conteniendo 2 µg/ml de AMD -el medio de cultivo usado para los cambios en los controles no contiene AMD-. La producción viral fue determinada por plaqueo en células Vero (ver Materiales y Métodos, 4.). En el momento de la recolección del sobrenadante las monocapas celulares fueron tripsinizadas y las células dispersadas se contaron en una cámara de Neubauer. Cada una de las determinaciones se llevó a cabo por duplicado y los virus infectivos de los sobrenadantes obtenidos en cada caso se valoraron en dos titulaciones independientes. Los resultados se obtuvieron promediando estas determinaciones y se expresaron en UFP/cél. La producción viral en células tratadas con AMD se refirió a la producción determinada para los controles correspondientes, no tratados con la droga.

[#] Los resultados se expresaron como el valor medio ± desviación estandard para el número de experimentos indicados entre paréntesis. Los títulos virales para los diferentes experimentos variaron entre 2×10^2 a 3×10^3 UFP/ml y entre 7×10^4 y 2×10^5 UFP/ml para los virus Pichinde y Tacaribe, respectivamente, cuando los virus fueron recolectados a tiempos cortos después de la infección. Cuando la recolección se llevó a cabo en la fase estacionaria del crecimiento viral los títulos variaron entre 5×10^5 y 7×10^6 UFP/ml para virus Junín, 2×10^7 y 9×10^7 UFP/ml para virus Pichinde y 3×10^6 y 2×10^7 UFP/ml para virus Tacaribe. Los valores medios para el número de células tratadas con AMD por 11-12 h o 9 h fueron de 73 y 79% respectivamente con respecto a los controles no tratados.

y Pichinde en diferentes estadios del ciclo de replicación viral. Puede observarse que en etapas tempranas del ciclo los virus Tacaribe y Pichinde no necesitan de la transcripción celular simultánea para su replicación. La producción de virus Junín a tiempos cortos después de la infección, a pesar de no mostrar diferencia entre la producción obtenida en células tratadas y no tratadas con AMD, pudo estimarse en diferentes experimentos (3) a partir del recuento de no más de 20 placas de lisis por cada sobrenadante. Debido al riesgo que supone aceptar como correctos los títulos así obtenidos hemos decidido no analizar dichos datos en el presente trabajo. Puede observarse además, que en la fase estacionaria de crecimiento viral la AMD no afecta la producción de ninguno de los tres arenavirus estudiados. Esto significa que la transcripción celular simultánea tampoco es necesaria para la replicación viral durante la fase estacionaria de crecimiento. El hecho de que en células BHK₂₁ infectadas con virus Pichinde se observen a las 24-48 HPI niveles normales de antígenos virales sintetizados en presencia de AMD (Rawls y col., 1976), está de acuerdo con nuestra conclusión de que la transcripción y posterior traducción del genoma viral no dependen de la transcripción celular simultánea en la fase estacionaria del ciclo de replicación viral.

Los resultados aquí presentados son diferentes a las observaciones previas realizadas por otros autores, quienes encontraron que el crecimiento de los arenavirus es inhibido por la AMD (Buck y Pfau, 1964; Mifune y col., 1971; Rawls y col., 1976; Stanwick y Kirk, 1971). En dichos estudios, sin embargo, las células infectadas fueron expuestas a la acción de la droga por períodos prolongados, observándose una disminución importante de la producción viral a partir de las 24 h después de exponer las células a la AMD. El análisis de estos trabajos a la luz de nuestros resultados sugiere dos posibilidades: o bien las células son incapaces de soportar la replicación viral debido a un efecto tóxico del inhibidor, o bien los arenavirus necesitan de transcriptos celulares de vida media larga para su replica-

ción. Algunos resultados sugieren como más probable la primera posibilidad; por ej., en nuestras manos, después de la exposición de células BHK21 por 9 h a la acción de la AMD, aparecen los primeros signos de efectos tóxicos sobre las mismas (aumento de la vacuolización celular y desprendimiento de las células de la monocapa), los cuales coinciden con una disminución en la producción de virus infectivos. Un efecto similar puede observarse al analizar el trabajo de Rawls y col. (1976), quienes determinaron la producción de virus Pichinde en células BHK21 sometidas a la acción de la AMD por 24 y 48 h. A dichos tiempos menos del 6% de las células permanecía aún en la monocapa (¿vivas?) con respecto a los controles no tratados.

Otros inhibidores diferentes de la AMD han sido utilizados para evaluar la participación de funciones nucleares en la replicación de los arenavirus. Por ejemplo, se ha encontrado que la α -amanitina inhibe la replicación del virus Tacaribe en células PK-13 (Mersich y col., 1979). Sin embargo, en este trabajo se exponen las células a la acción de la droga por períodos prolongados (mínimo 12 h), en los cuales podrían ponerse de manifiesto efectos tóxicos similares a los que presenta la AMD. Por otra parte, en dicho trabajo no se indica el estado de las células tratadas con la droga, ni tampoco cómo se expresa la producción viral para calcular el porcentaje de inhibición, por lo cual se hace difícil un análisis más profundo del mismo. Por último el análisis de la producción de virus Pichinde en células BHK21 enucleadas con citochalasina B, mostró que en las células enucleadas inmediatamente antes de la infección la producción viral disminuía notablemente después de las 24-48 HPI con respecto a las células no enucleadas usadas como control y que el nivel de antígenos virales a 24 HPI sólo difiere respecto de los controles no tratados cuando la enucleación se llevó a cabo, como mínimo, 12 h antes (Banerjee y col., 1975/76). Sin embargo, debido a que la interpretación de los resultados se hace difícil después de 10 h de realizada la enucleación (Ortín y Viñuela, 1977), se genera la misma incertidumbre que en los casos anterior-

res. De todas formas, a pesar de que no existe una clara evidencia, no puede descartarse la posibilidad de que los arenavirus necesiten de la transcripción de componentes celulares de vida media larga o de otras funciones nucleares distintas de la transcripción. Nuestros resultados sólo indican que los arenavirus no necesitan de la transcripción celular simultánea para su replicación, ni en la fase inicial, ni en la fase estacionaria de su ciclo de crecimiento.

CONCLUSIONES

Durante el presente capítulo se han analizado diferentes aspectos de la replicación en células BHK₂₁ de 3 arenavirus, los virus Junín, Tacaribe y Pichinde. Se estudió, en primer lugar, cada una de las etapas del ciclo de crecimiento viral. En segundo lugar, se investigó la interacción virus-célula analizando el efecto de la actinomicina D sobre la replicación de dichos arenavirus. Con respecto al primer punto se han aportado los siguientes resultados originales:

- 1) La constante de adsorción de virus Tacaribe en células BHK₂₁ -al igual que en células Vero- es del orden de $3 \times 10^{-8} \text{ ml cel}^{-1} \text{ min}^{-1}$.
- 2) La infectividad específica (UFP/ μg de ARN viral) es 20 veces superior para el virus Pichinde que para los virus Tacaribe y Junín. Sin embargo, la masa de ARN genómico viral producido por célula y por unidad de tiempo es muy similar (aproximadamente $10^{-15} \text{ gr/h.cél.}$). Estos resultados permiten explicar las diferencias observadas en las curvas de crecimiento viral, en las cuales los títulos máximos del virus Pichinde son 20 veces superiores a los logrados por los virus Tacaribe y Junín.
- 3) Se ha observado que la presencia de partículas DI durante la infección induce cambios en las curvas de crecimiento de virus Tacaribe. Este resultado sugiere cierta participación de las partículas DI en la regulación de la replicación de los

virus infectivos, apoyando la hipótesis inicialmente presentada por Dutko y Pfau (1978).

4) Se determinó el tiempo de generación viral -en la fase estacionaria de crecimiento- para tres arenavirus: Junín, Tacaribe y Pichinde. Se encontró que en menos de 6 h los arenavirus son capaces de replicar su material genético, ensamblarse y salir al medio extracelular.

Por último, el análisis de la replicación de los virus Junín, Tacaribe y Pichinde en presencia de actinomicina D, en condiciones en las cuales se disminuyen los efectos tóxicos de la droga, permitió demostrar que los arenavirus no necesitan de la transcripción celular simultánea para su replicación.

CAPITULO II

PARTE I

- A. Obtención de "stocks" CPE(+) y CPE(-) de virus Tacaribe.**
- B. Efecto de la infección de células Vero con "stocks" CPE(+) y CPE(-) de virus Tacaribe.**
- C. Efecto de la infección de diferentes líneas celulares con "stocks" CPE(+) de virus Tacaribe.**

A. OBTENCION DE "STOCKS" CPE (+) Y CPE (-) DE VIRUS TACARIBE.

1. Consideraciones preliminares.

Como se mencionó antes, los arenavirus tienen la capacidad de replicar en diferentes sistemas celulares. En la mayoría de las líneas celulares (células MDBK, BHK₂₁, HeLa, BALB/C 3T3) estos virus replican sin producir efectos aparentes sobre la integridad celular, mientras que en otras líneas celulares (Vero, MDCK) son capaces de generar placas de lisis. De hecho, estos virus son titulados por el método de formación de placas en células Vero (ver Materiales y Métodos -4-). Sin embargo, cuando se infectan células Vero o MDCK con elevada m.d.i., la aparición de efecto citopático (CPE) y lisis celular no se presenta o es poco evidente, estableciéndose, generalmente, una infección persistente (Pedersen, 1978; Rawls y Leung, 1979). Varios autores (Dutko y Pfau, 1978; Hotchin, 1971; Lehman-Grube, 1971; Staeneck y col., 1972; Welsh y Pfau, 1972) asignan la pérdida de la capacidad lítica de los arenavirus a la presencia en los "stocks" virales de proporciones variables de las denominadas partículas defectivas interferebtes (DI). Estas DI sólo han sido detectadas por su acción biológica (interferencia) y no han sido caracterizadas desde el punto de vista molecular. Con respecto a esto último, los intentos realizados por diferentes autores arrojaron resultados contradictorios (ver Introducción).

El hecho de que los arenavirus sean capaces de formar placas de lisis en células Vero (Mifune y col., 1971) y que la capacidad de formar placas pueda ser eliminada por el agregado de partículas DI (Dutko y Pfau, 1978), sugiere que los virus infectivos (VI) sí serían capaces de afectar la integridad celular y que esta capacidad citolítica podría ser eliminada por la presencia de DI durante la infección. Si esto fuera así, resulta claro que para estudiar los eventos moleculares que conducen, o bien a la lisis celular o al establecimiento de una infección persistente sería necesario disponer de "stocks" virales ricos en

VI, en el primer caso, y en DI, en el segundo. La obtención de "stocks" virales con estas características podría lograrse por dos caminos diferentes: 1) Como todas las preparaciones de arenavirus parecen estar constituidas por mezclas en proporciones variables de DI y VI, la obtención de "stocks" ricos en VI o DI, podría lograrse utilizando un método fisicoquímico que permitiera separar ambos tipos de partículas. Sin embargo, debido a que las partículas DI no han sido aún definidas desde el punto de vista molecular, resulta difícil pensar en adoptar un método fisicoquímico para separarlas de los VI. 2) Una segunda posibilidad consistiría en buscar condiciones de propagación viral que permitieran aumentar o disminuir a voluntad la proporción relativa de VI y DI. Se sabe que la relación de DI a VI en cada preparación viral y para los diferentes arenavirus, depende de diversos factores, como ser, la línea celular utilizada para su preparación, la m.d.i. y el tiempo transcurrido entre la infección de las células y la recolección de los sobrenadantes correspondientes (Dutko y Pfau, 1978; Martínez-Peralta, 1981). Consideramos posible, por lo tanto, obtener "stocks" virales con diferente proporción de DI y VI modificando estas variables. Esta parte del trabajo la hemos llevado a cabo utilizando virus Tacaribe como modelo del grupo. Este virus fue elegido por ser antigénicamente muy parecido al virus Junín -agente etiológico de la fiebre hemorrágica argentina-, pero, a diferencia de este último, no es patógeno para el hombre (Weissenbacher y col., 1975/76).

2. Estrategia utilizada para la obtención de "stocks" virales.

Con el objeto de trabajar con poblaciones virales homogéneas, las preparaciones de virus Tacaribe fueron obtenidas a partir de un virus clonado en células Vero. Para ello, en cada caso se aisló la progenie derivada de un único virus infectivo (placa de lisis), que fue luego propagada en células BHK21. De aquí en más, la proporción de DI en la preparación final dependería de la estrategia utilizada. Debido a que, como ya indicamos

antes, la replicación de dichas DI depende de la presencia de, al menos, un VI en la misma célula, el aumento en la proporción de las DI se vería favorecido por condiciones que propiciaran la coinfección de las células con partículas DI y VI, como por ej.: una elevada m.d.i. y la realización de múltiples ciclos de replicación (recolección a tiempos largos post-infección y la realización de varios pasajes por células). Por lo tanto, con el objeto de obtener "stocks" con baja proporción de DI, los clones aislados de células Vero fueron amplificados en células BHK21 utilizando una baja m.d.i. (≤ 0.03 UFP/cél.), recolectando los sobrenadantes celulares no más allá del 4° día post-infección y evitando realizar más de dos pasajes en células BHK21 en las condiciones mencionadas. Por otra parte, para la obtención de "stocks" con una alta proporción de DI, los clones fueron amplificados a m.d.i. elevadas (> 5 UFP/cél.), recolectando los sobrenadantes después del 5° día post-infección y realizando bajo estas condiciones, generalmente, 4 pasajes en células BHK21 (los detalles operacionales correspondientes a la preparación de "stocks" se describen en Materiales y Métodos -10.1-).

El dosaje de UFP y DI (ver Materiales y Métodos) reveló que el primer método permitía obtener "stocks" con una relación DI/UFP $\leq 10^{-4}$, mientras que la aplicación del segundo método permitía conseguir "stocks" con una relación DI/UFP variando entre 0,2 y 20, según las condiciones de preparación. Por razones que veremos a continuación, denominamos CPE (+) a los "stocks" que poseen una baja proporción de DI y "stocks" CPE (-) a los que poseen una elevada proporción de DI.

B. EFECTO DE LA INFECCION DE CELULAS VERO CON "STOCKS" CPE (+) Y CPE (-) DE VIRUS TACARIBE.

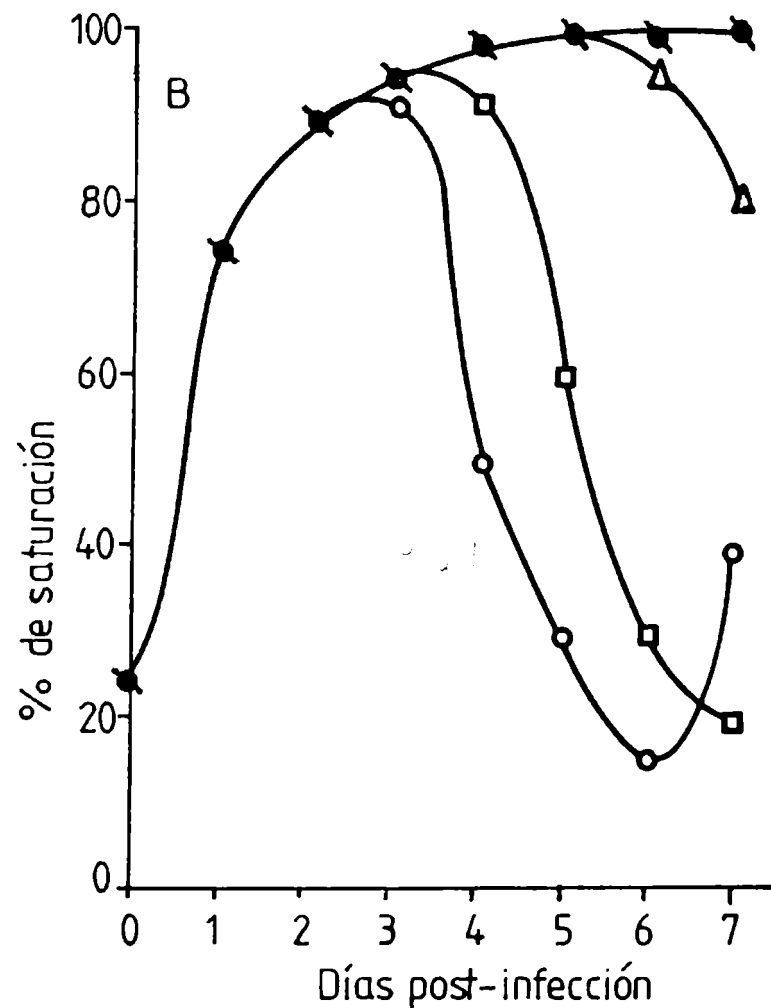
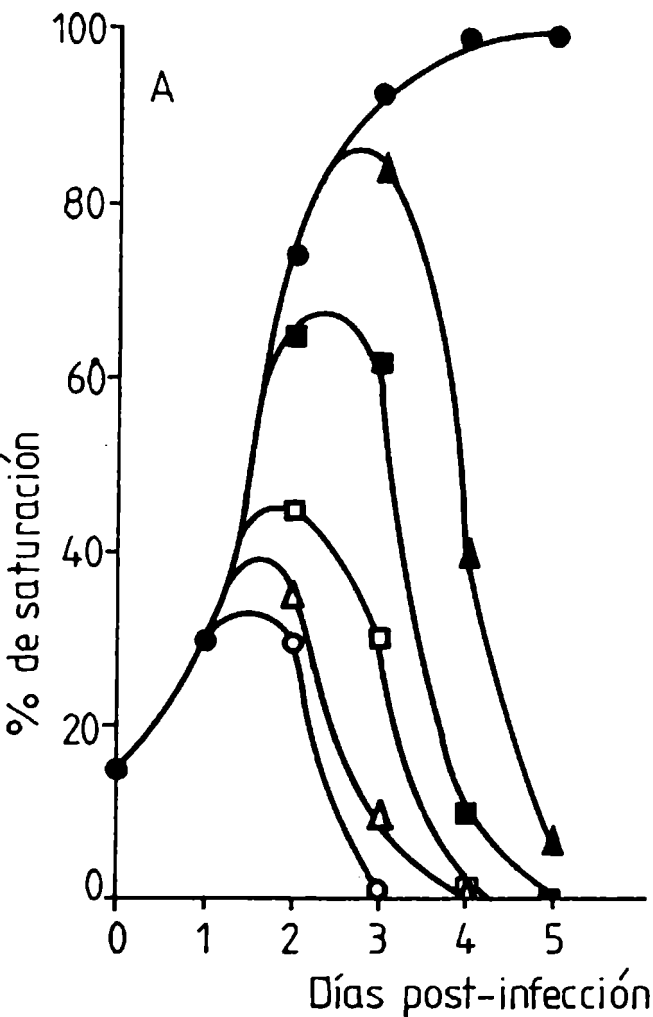
1. Efecto citopático.

Si la ausencia de CPE observada por otros autores al infectar con alta m.d.i. células Vero con arenavirus fuera consecuencia de la elevada proporción de DI en los inóculos usados, debería

esperarse un comportamiento diferencial al infectar dichas células con "stocks" CPE (+) y CPE (-) de virus Tacaribe a alta m.d.i.: los "stocks" CPE (+), debido a su baja proporción de DI, deberían inducir la lisis celular (al igual que lo hacen durante la formación de placas en la titulación) como efecto de la replicación de los VI; por otra parte, la alta proporción de DI en los "stocks" CPE (-) debería producir infecciones que no condujeran a la citolisis (infecciones persistentes). Con el objeto de analizar la capacidad citopatogénica de cada uno de los "stocks" virales se infectaron células Vero con distinta m.d.i., realizándose el recuento diario de las células (Fig. II.1.). La parte A de la Fig. II.1. muestra el comportamiento de células Vero infectadas con un "stock" CPE (+). Puede observarse que a m.d.i. elevadas (> 3 UFP/cél.) se produce una respuesta lítica definida de la monocapa celular a partir de las 40 HPI. Los primeros signos de CPE (vacuolización celular, alteraciones morfológicas, etc.) se observan a partir de las 30 HPI. Al disminuir la m.d.i. utilizada puede verse un retraso en la aparición del CPE; en este caso, el virus debe sufrir varios ciclos de replicación para lograr la infección de todas las células del cultivo. El hecho de que no pueda disminuirse el tiempo de aparición del CPE por debajo de las 40 HPI con el aumento de la m.d.i. sugiere, por un lado, que se ha logrado la infección total y sincrónica de la monocapa celular y por otro lado, que el período mencionado (40 h) es el mínimo necesario para que el virus (VI) provoque la lisis celular.

La parte B de la Fig. II.1. muestra el comportamiento de células Vero infectadas con un "stock" CPE (-) de virus Tacaribe. Puede verse claramente que aquellas células infectadas con m.d.i. elevadas no provocan CPE, siendo su comportamiento idéntico al de las células no infectadas usadas como control. Sin embargo, en condiciones en las cuales no se favorece la coinfección de las células con DI y VI (m.d.i. baja) puede observarse el efecto lítico provocado por las VI. En algunos casos (m.d.i. = 0.01 UFP/cél.) es evidente la recuperación de la monocapa celular

Figura II.1. ANALISIS DE LA CAPACIDAD CITOPATOGENICA DE "STOCKS" CPE(+) y CPE(-) DE VIRUS TACARIBE. Monocapas de células Vero crecidas en cajas de Petri de 35 mm de diámetro fueron infectadas con diferentes m.d.i. de un "stock" CPE(+) (A) o CPE(-) (B). Día a día se determinó el porcentaje de saturación de la monocapa (Materiales y Métodos, 9.) En la figura se indica la variación de dicho porcentaje en función del tiempo para distintas m.d.i.: A, $120 \pm 30 \pm 3$ (○); 1,5 (Δ); 0,3 (□); 0,15 (■); 0,06 (▲) y control no infectado (●); B, 10 ± 6 (■); 0,01 (○); 0,006 (□); 0,0007 (Δ) y control no infectado (●).

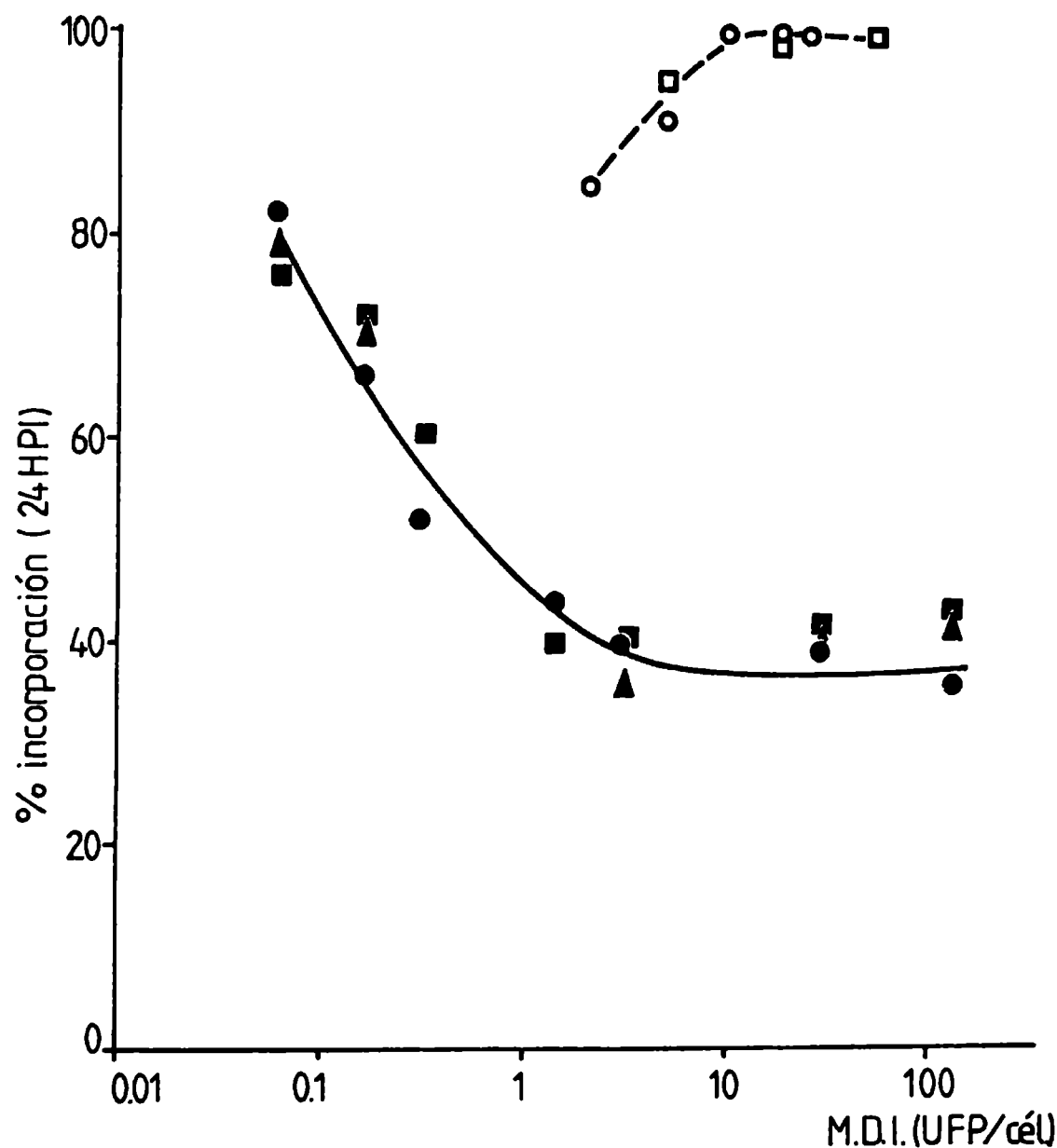


a partir de las células que han logrado ser coinfectadas por DI y VI después de varios ciclos de replicación.

2. Efecto sobre la síntesis de macromoléculas celulares.

Todos los virus animales conocidos que poseen capacidad citopatogénica (citolíticos) inducen, en mayor o menor medida, la inhibición de la síntesis de macromoléculas celulares (Fenner y col., 1974; Shatkin, 1983). En algunos casos, dicha inhibición es la responsable directa de la producción del CPE, mientras que, en otros casos, estos fenómenos son totalmente independientes (Shatkin, 1983). Con el objeto de analizar el efecto de la replicación en los distintos "stocks" de virus Tacaribe sobre la síntesis de macromoléculas celulares se estudió, en primer lugar, el efecto de la m.d.i. sobre la síntesis de proteínas celulares. Para ello se determinó la incorporación total de [^3H]-leucina en células Vero infectadas a diferentes m.d.i. con "stocks" CPE (+) y CPE (-) de virus Tacaribe. La incorporación del radioactivo en las células infectadas se estudió a las 24 HPI, poco antes de que aparecieran los primeros signos de CPE. En estas condiciones (comparando con lo ocurrido para otros sistemas virus-célula) el efecto sobre la síntesis de macromoléculas debería ser máximo. La Fig. II.2. permite observar que la infección con un "stock" CPE (+) provoca una disminución importante en la incorporación del precursor radiactivo, que se magnifica con el aumento de la m.d.i. hasta alcanzar un nivel estable a m.d.i. ≥ 3 UFP/cél. (en estas condiciones estadísticamente se espera tener más del 95% de las células infectadas). Puede observarse, también que la infección con un "stock" CPE (-) a m.d.i. elevada no produce efecto alguno sobre la incorporación del precursor marcado. A multiplicidades más bajas se observa una pequeña disminución en la incorporación, debido a que una fracción de células ha sido infectada con VI, pero no con DI. Este es un efecto similar al observado durante el desarrollo del CPE a bajas m.d.i. en células Vero infectadas con un "stock" CPE (-).

Figura 11.2. EFECTO DE LA MULTIPLICIDAD DE INFECCION SOBRE LA INCORPORACION DE $[^3\text{H}]$ -LEUCINA EN CELULAS VERO. Células Vero fueron infectadas, o no (controles), con un "stock" CPE(+) (símbolos llenos) o un "stock" CPE(-) (símbolos vacíos) de virus Tacaribe a diferentes multiplicidades. Entre las 23 y 24 HPI las células fueron marcadas con $[^3\text{H}]$ -leucina y se determinó luego la radiactividad ácido precipitable (según se describe en Materiales y Métodos, 13.) Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control no infectado. Los símbolos diferentes indican los resultados de experimentos independientes.



Con el objeto de demostrar que estas propiedades no representan un hecho fortuito (aislamiento de mutantes, etc.), sino que dependen exclusivamente de la forma en la que se preparan cada uno de los "stocks", se analizó la incorporación de $[^3\text{H}]$ -leucina en células Vero infectadas con "stocks" CPE (+) y CPE (-), preparados a partir de diferentes clones de virus Tacaribe. Con el fin de acotar temporalmente este fenómeno, se realizaron las determinaciones a diferentes tiempos post-infección. Los resultados mostrados en la Fig. II.3. permiten observar que la infección con cualquiera de los "stocks" CPE (+) provenientes de diferentes clones de virus Tacaribe, disminuye la incorporación de $[^3\text{H}]$ -leucina a las proteínas celulares. El nivel de $[^3\text{H}]$ -leucina intracelular medido como material ácido soluble (Tabla II.1.), no se modificó a lo largo del período estudiado, por lo cual, la disminución en la incorporación del aminoácido marcado es indicativa de una inhibición de la síntesis proteica.

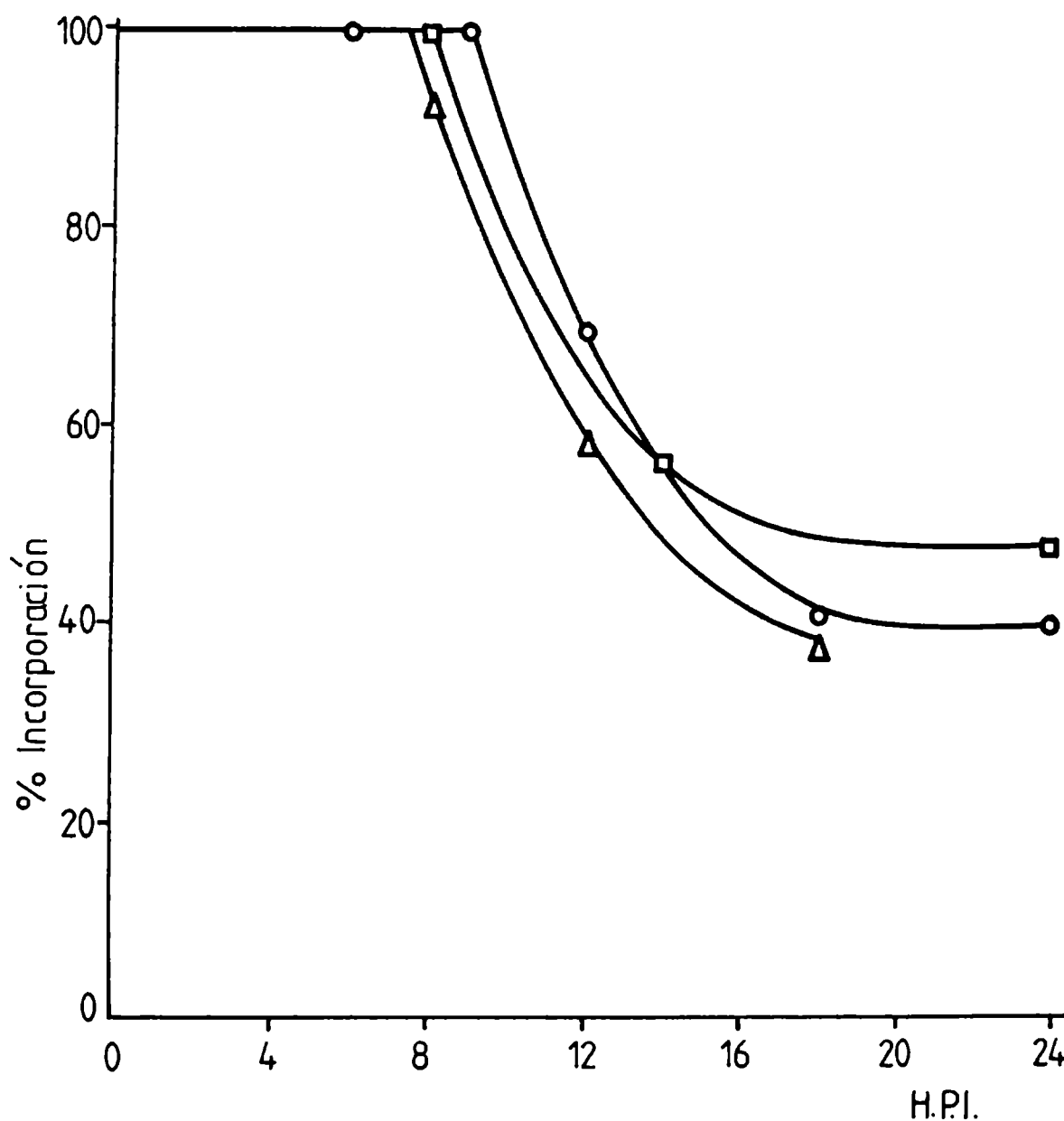
Tabla II.1.: MEDIDA DEL NIVEL INTRACELULAR DE $[^3\text{H}]$ -LEUCINA EN CELULAS VERO INFECTADAS CON UN "STOCK" CPE (+) DE VIRUS TACARIBE.

HPI ⁺	x $[^3\text{H}]$ -leucina [#]	
	ácido soluble	ácido precipitable
0	100	100
15	100	45
22	90	30

⁺ Las células fueron infectadas a m.d.i. = 3 UFP/cél.

[#] La radioactividad ácido soluble y ácido precipitable fue determinada y corregida por la cantidad de DNA del cultivo como se indica en Materiales y Métodos.

Figura 11.3. EFECTO DE LA INFECCION CON "stocks" CPE(+) DE VIRUS TACARIBE SOBRE LA INCORPORACION DE $[^3\text{H}]$ -LEUCINA EN CELULAS VERO EN FUNCION DEL TIEMPO POST-INFECCION. Células Vero fueron infectadas, o no (controles), con "stocks" CPE(+) de virus Tacaribe a m.d.i. ≈ 6 . A los tiempos indicados las células se marcaron con $[^3\text{H}]$ -leucina y se midió su incorporación al material ácido precipitable como se indicó en Materiales y Métodos (13). Los diferentes símbolos indican infecciones llevadas a cabo con "stocks" CPE(+) preparados en forma independiente a partir de distintos clones de virus Tacaribe.



Por otra parte, la infección de células Vero con "stocks" CPE (-) obtenidos a partir de diferentes clones de virus Tacaribe, es incapaz de afectar la síntesis proteica de las células hospedadoras (Fig. II.4.). El hecho de que los mismos resultados puedan obtenerse a partir de diferentes clones de virus Tacaribe preparados en forma independiente, permite asegurar que el fenómeno es general y no un hecho fortuito como podría ser el aislamiento de una variante genética del virus original.

La marcación con [^3H]-timidina y [^3H]-uridina de células Vero infectadas con un "stock" CPE (+) de virus Tacaribe, reveló una disminución apreciable en la incorporación de dichos precursores a los ácidos nucleicos correspondientes (DNA y RNA respectivamente) en función del tiempo post-infección (Tabla II.2.). La constancia del nivel intracelular de los precursores marcados (medido como material ácido soluble) indica que la disminución en la incorporación de dichos precursores se debe a la inhibición de la síntesis de DNA y RNA y no a un problema de transporte de los mismos. De igual forma que lo observado para la síntesis proteica, la infección de células Vero con "stocks" CPE (-)

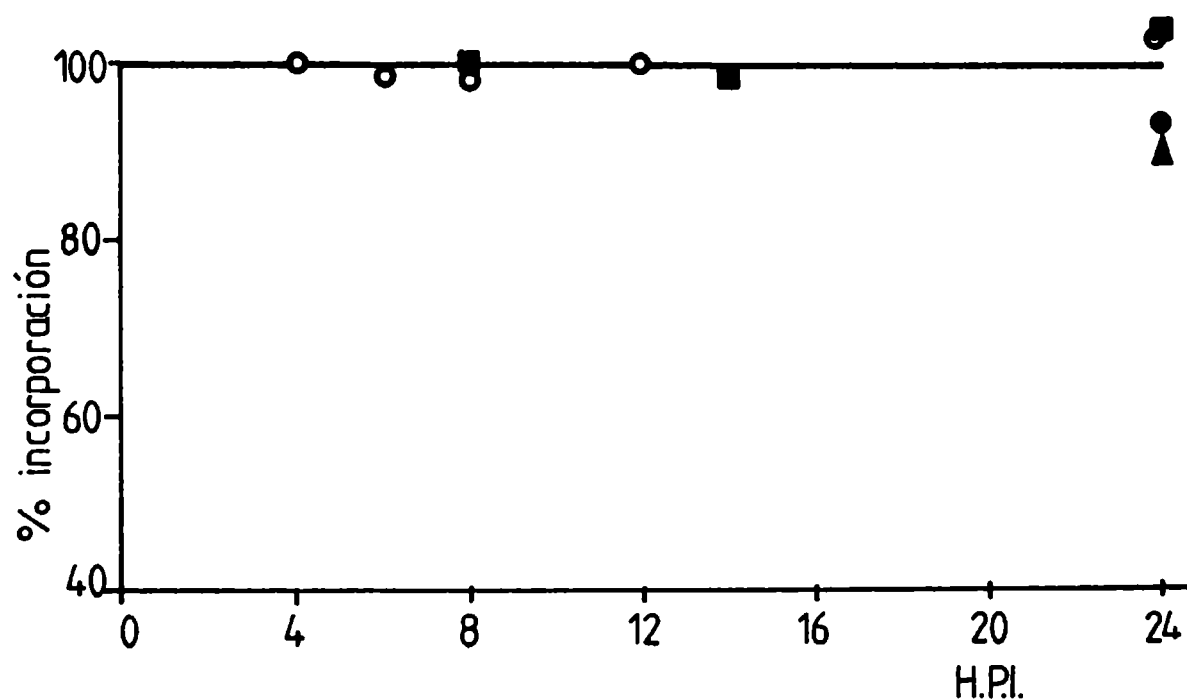
Tabla II.2.: EFECTO DE LA INFECCION DE CELULAS VERO CON UN "STOCK" CPE (+) DE VIRUS TACARIBE
SOBRE LA SINTESIS DE ARN Y ADN CELULAR.

hpi ⁺	x [^3H]-timidina [#]		x [^3H]-uridina [#]	
	ácido soluble	ácido precipitable	ácido soluble	ácido precipitable
0	100	100	100	100
12	140	70	-	-
15	110	50	100	77
22	110	30	80	63

⁺ Las células se infectaron con m.d.i. = 3 según se indica en Materiales y Métodos.

[#] La radiactividad ácido precipitable y ácido soluble fue determinada y corregida por la cantidad de DNA celular como se indica en Materiales y Métodos.

Figura II.4. EFECTO DE LA INFECCION CON "STOCKS" CPE(-) DE VIRUS TACARIBE SOBRE LA INCORPORACION DE [3H]-LEUCINA EN CELULAS VERO EN FUNCION DEL TIEMPO POST-INFECCION. Células Vero fueron infectadas, o no (controles) con "stocks" CPE(-) de virus Tacaribe a m.d.i. ≈ 7 . A los tiempos indicados las células se marcaron con [3H]-leucina y se midió su incorporación al material ácido precipitable como se indicó en Materiales y Métodos (13.). Los diferentes símbolos indican infecciones llevadas a cabo con "stocks" CPE(-) preparados en forma independiente a partir de distintos clones de virus Tacaribe.



de virus Tacaribe, no produjo cambios en la síntesis de ácidos nucleicos. Por otra parte, experimentos realizados con células sincronizadas apuntalan fuertemente la idea de que la replicación de los virus infectivos afecta primariamente la síntesis de proteínas celulares, siendo un efecto secundario la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos (M.T. Franze-Fernández, observación no publicada).

Según se acaba de mostrar, existe diferencia en cuanto al efecto que producen sobre las células hospedadoras los "stocks" CPE (+) y CPE (-) de los virus Tacaribe. Esta diferencia, sin embargo, no se manifiesta a nivel de la producción de viriones infectivos. Como puede verse en la Tabla II.3. la producción de virus infectivos en ningún caso mostró una variación importante, ni aún a los tiempos en los cuales el efecto sobre la síntesis de macromoléculas celulares fue máximo (24 HPI).

Tabla II.3.: PRODUCCION DE VIRUS INFECTIVOS EN CELULAS VERO INFECTADAS CON "STOCKS" CPE (+)
Y CPE (-) DE VIRUS TACARIBE.

HPI	Producción viral en sobrenadantes celulares (UFP/10 ⁶ células) ⁺			
	Experimento 1 [#]		Experimento 2 [*]	
	CPE (+)	CPE (-)	CPE (+)	CPE (-)
2	(20	(20	ND	ND
8	$\sim 2 \times 10^2$	$\sim 2 \times 10^2$	ND	ND
16	1×10^4	$6,5 \times 10^3$	5×10^4	7×10^4
24	4×10^4	$2,6 \times 10^4$	1×10^5	6×10^4
48	ND	ND	Lisis	5×10^4

⁺ Los títulos virales son el promedio de dos titulaciones independientes realizadas sobre cada una de las determinaciones, llevadas a cabo, a su vez, por duplicado.

[#] m.d.i. = 2 UFP/cél. con ambos "stocks".

^{*} m.d.i. = 6 UFP/cél. con ambos "stocks".

ND = no determinado.

3. Relación inversa entre la inhibición de la síntesis proteica y la proporción de DI en los inóculos utilizados en la infección.

Con el objeto de analizar la capacidad de las DI para proteger a las células de la inhibición de la síntesis proteica generada por los VI, se determinó la incorporación de $[^3\text{H}]$ -leucina a las 24 HPI en células Vero infectadas con una cantidad constante de VI y proporciones variables de partículas DI. Esto último se logró agregando al momento de la infección, mezclas adecuadas de un "stock" CPE (+) y un "stock" CPE (-). La Fig. II.5. muestra los resultados obtenidos. Puede verse claramente una relación inversa entre la inhibición de la síntesis proteica y la proporción de DI en el momento de la infección. Este resultado sugiere que las partículas DI son capaces de revertir la inhibición de la síntesis proteica inducida por la replicación de los VI.

Se analizó, además, la producción intra y extracelular de VI a las 20 y 40 HPI en células Vero infectadas con diferentes proporciones de DI y la misma multiplicidad de VI (Tabla II.4.). Los resultados muestran claramente que ni a las 20,

Tabla II.4.: PRODUCCION DE VIRUS INFECTIVOS LIBRES Y ASOCIADOS A CELULAS EN CELULAS VERO INFECTADAS CON PROPORCIONES VARIABLES DE DI.

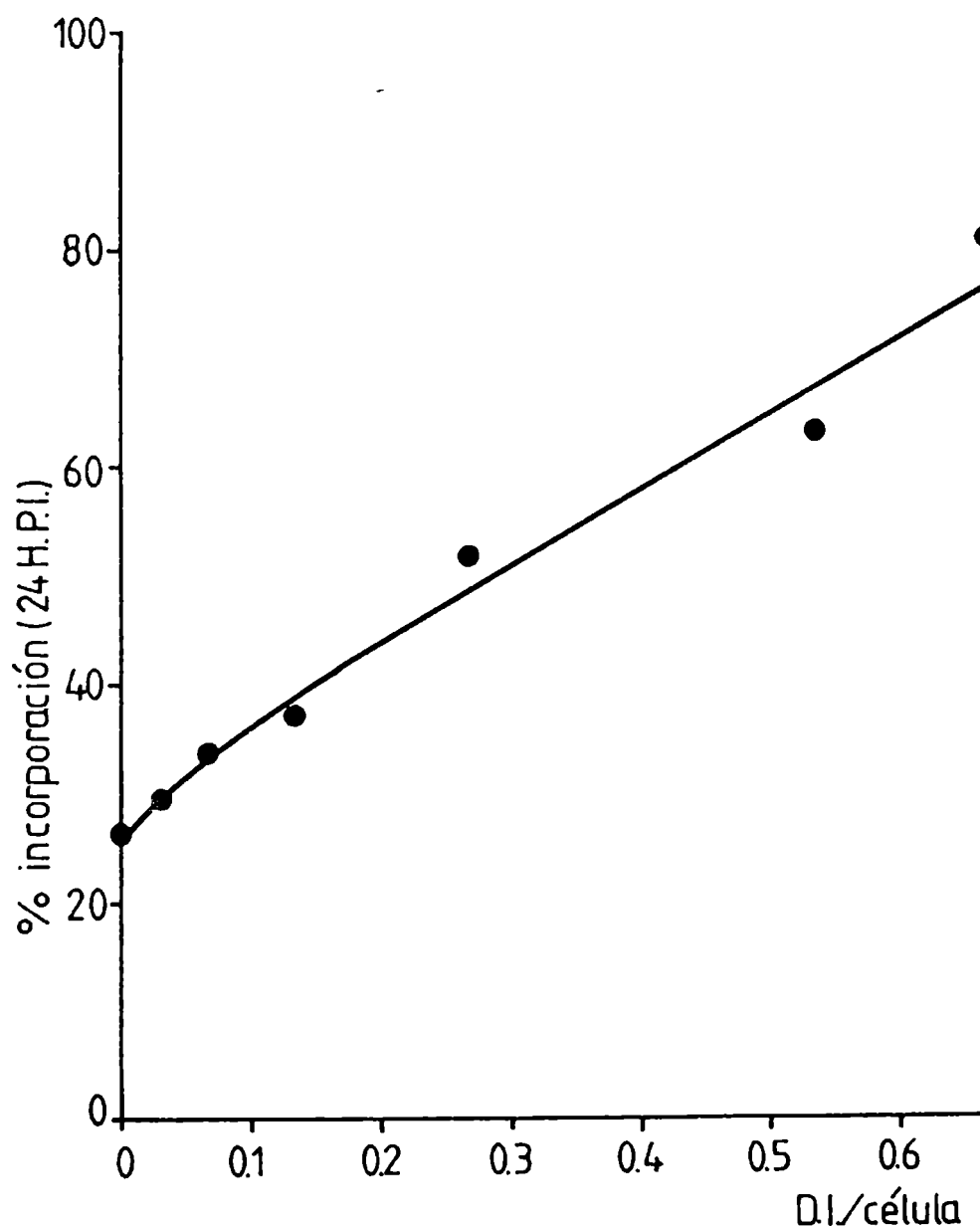
m.d.i.		Producción viral (UFP/10 ⁶ células)			
UFP/cél.	DI/cél.*	20 HPI		40 HPI	
		libre	asociado [†]	libre	asociado [‡]
3	0.001 [*]	$1,2 \times 10^4$	0.9×10^6	$2,4 \times 10^5$	$2,8 \times 10^6$
3	0.06	$1,4 \times 10^4$	$1,3 \times 10^6$	$2,7 \times 10^5$	$2,1 \times 10^6$
3	0.25	$1,2 \times 10^4$	0.6×10^6	$1,7 \times 10^5$	$2,7 \times 10^6$
3	0.63	0.8×10^4	0.7×10^6	$1,3 \times 10^5$	$1,3 \times 10^6$

* Las diferentes proporciones de DI a UFP se lograron con mezclas de "stocks" CPE (+) y CPE (-).

[†] Infección con un "stock" CPE (+).

[‡] Las células se lisaron mediante tres ciclos frío-calor y los virus liberados se titulan por el método de plaqueo en células Vero (Materiales y Métodos -4-).

Figura 11.5. RELACION DE LA PROPORCION DE PARTICULAS DI EN EL MOMENTO DE LA INFECCION CON LA PROTECCION DE LA INHIBICION DE LA SINTESIS PROTEICA. Células Vero fueron infectadas con mezclas de proporciones variables de "stocks" CPE(+) y CPE(-) de forma de mantener la m.d.i. constante (3 UFP/cél.) y poder modificar la proporción de DI/cél. A las 24 HPI las células se marcaron con $[^3\text{H}]$ -leucina y se analizó la radiactividad ácido precipitable como se describe en Materiales y Métodos (13.). Se muestra el porcentaje de incorporación con respecto a los controles no infectados en función de la relación DI/cél. en el momento de la infección.



ni a las 40 HPI existe una diferencia significativa en la producción intra y extracelular de VI por las células infectadas con diferentes proporciones de DI. Debe recordarse que a partir de las 20 HPI la inhibición de la síntesis proteica es máxima y que a las 40 HPI se observan importantes signos de CPE en el caso de las células infectadas con un "stock" CPE (+).

C. EFECTO DE LA INFECCION DE DIFERENTES LINEAS CELULARES CON "STOCKS" CPE (+) DE VIRUS TACARIBE.

Hasta el momento hemos estudiado el efecto de la replicación de virus Tacaribe en células Vero. Hemos encontrado que "stocks" con baja proporción de partículas DI (CPE (+)) inducen la producción de CPE e inhibición de la síntesis de macromoléculas celulares cuando se infectan las células con alta m.d.i. Consideramos interesante analizar en otras líneas celulares el efecto de la infección sincrónica con un "stock" CPE (+) de virus Tacaribe. Se encontró (resultados no mostrados) que la infección de células BHK21 y BALB/C 3T3 con dichos "stocks" no produce signos patológicos en las mismas. Sin embargo, la infección de células MDCK con "stocks" CPE (+) produjo un CPE menos importante que el observado en células Vero, con una menor proporción de células afectadas (no se observa lisis total de la monocapa celular) y una elevada capacidad de recuperación celular. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Dutko y Pfau (1978) en células MDCK con los arnavirus Pichinde y LCM.

Por otra parte, con el objeto de verificar la posible correlación entre el efecto lítico y la inhibición de la síntesis de macromoléculas celulares, se analizó en forma comparativa el efecto sobre la incorporación de [3 H]-leucina, [3 H]-uridina y [3 H]-timidina a 24 y 48 HPI, en células Vero y BHK21 infectadas con un "stock" CPE (+) de virus Tacaribe. Los resultados presentados en la tabla II.5. permiten observar que, a diferencia de lo que ocurre en células Vero, la replicación de los VI no

Tabla 11.5.: ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO DE LA INFECCION CON UN "STOCK" CPE (+) DE VIRUS TACARIBE SOBRE LA SINTESIS DE PROTEINAS, ADN Y ARN EN CELULAS VERO Y BHK₂₁.

Linea celular	HPI ⁺	incorporacion (% del control)		
		[³ H]-leucina	[³ H]-timidina	[³ H]-uridina
BHK ₂₁	24*	82	90	100
	48	86	106	100
Vero	24*	30	25	42
	48	Lisis	Lisis	Lisis

⁺ m.d.i. = 10 UFP/cél.

* Los títulos en los sobrenadantes celulares a las 24 HPI fueron de 5×10^6 y 7×10^4 UFP/ml en células BHK₂₁ y Vero, respectivamente.

produce ningún efecto sobre la síntesis de macromoléculas celulares y el CPE. Sin embargo, el hecho de que estos dos fenómenos se presenten siempre asociados no significa, necesariamente, que sean una consecuencia del otro.

CAPITULO II

PARTE II

**Análisis de la replicación de virus
Tacaribe en células Vero.**

ANALISIS DE LA REPLICACION DE VIRUS TACARIBE EN CELULAS VERO.

Como se indicó previamente, el objetivo a largo plazo de nuestro trabajo consiste en estudiar las bases moleculares de los diferentes eventos que se producen en la célula hospedadora durante las infecciones líticas y no líticas. Esto significa, analizar en cada uno de los casos el mecanismo de replicación viral y la secuencia temporal en la que se producen los mencionados eventos. Para llevar a cabo este análisis, es imprescindible obtener una infección total y sincrónica de la monocapa celular. Por este motivo, antes de comenzar con el análisis del mecanismo de replicación viral, estudiamos la eficiencia de infección de las células Vero con virus Tacaribe.

1. Caracterización de la infección.

Analicemos nuevamente las Figs. II.1.A. y II.2. descritas en el presente capítulo, correspondientes a la producción de CPE y de la inhibición de la síntesis de proteínas en células Vero infectadas con diferentes multiplicidades de un "stock" CPE (+) de virus Tacaribe. En ambas figuras, se puede evidenciar que el efecto producido por la replicación del VI no puede magnificarse con el aumento de la m.d.i. cuando esta alcanza un valor de 3 UFP/cél. Estos datos sugieren que el inóculo ha alcanzado su máxima capacidad de infección y que la eficiencia de dicha infección debería ser elevada (cercana al 100%). Sin embargo, el análisis bibliográfico sobre la eficiencia de infección de los arenavirus sugiere que estos virus infectan en forma poco eficiente; por ej. se ha descrito que en células Vero infectadas con virus Junín la eficiencia de infección a las 24 HPI, determinada por el método de centros infectivos, es de sólo el 3% (Coto y col., 1970) y por el método de inmunofluorescencia de sólo un 7% (Martínez-Peralta, 1979). Otros autores, encuentran a las 24 HPI para otros miembros de la familia de los arenavirus (Pichinde, LCM) en otras líneas celulares (BHK₂₁, células L) no más del 66% de células inmunofluorescentes (Buchmeier y col.,

1978; Dimock y col., 1982; Rawls y col., 1976) y no más del 20% de células productoras de virus (centros infectivos) (Dimock y col., 1982).

En el presente trabajo, con el objeto de analizar la eficiencia de infección se utilizaron dos caminos diferentes: por un lado se midió la fracción de células productoras de antígenos virales utilizando el método de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y por el otro, la fracción de células capaces de generar virus infectivos mediante el método de cuantificación de centros infectivos (CI) (ver Materiales y Métodos -6 y 12-). Consideramos que la determinación debía realizarse en ambos casos al tiempo más corto posible después de la infección, de forma de evitar que los virus producidos durante el primer ciclo replicativo pudieran reinfectar nuevas células. Con el objeto de determinar el tiempo mínimo en el cual podía observarse inmunofluorescencia específica, se realizó la determinación de antígenos virales (totales y de superficie) en células Vero infectadas (m.d.i.= 5) con "stocks" CPE (+) y CPE (-) a diferentes tiempos post-infección (Fig. II.6.). Los resultados permiten ver claramente que ya desde las 4 HPI pueden detectarse, en ambos casos, antígenos totales (Fig. II.6.A.) y de superficie (Fig. II.6.B.) específicos virales, con un aumento importante de la inmunofluorescencia en función del tiempo. Con respecto a este punto debe destacarse que la intensidad de la inmunofluorescencia fue siempre menor en las células infectadas con "stocks" CPE (-), siendo más evidente esta diferencia a medida que aumenta el tiempo después de la infección. Por otra parte, estas observaciones microscópicas permiten ver, en ambos casos, que ya desde las 4 HPI la mayor parte de las células presenta inmunofluorescencia positiva, lo cual es indicativo de una elevada probabilidad de obtener una infección total de la monocapa celular. Sin embargo, la observación microscópica con bajo aumento -condición en la cual se hace el recuento celular- hace difícil cuantificar las células inmunofluorescentes a las 4 HPI, debido al bajo nivel de antígenos virales intracelulares. Se decidió, por lo tanto, realizar

Figura II.6.A. CINETICA DE APARICION DE ANTIGENOS VIRALES TOTALES EN CELULAS VERO INFECTADAS CON "STOCKS" CPE (+) Y CPE (-) DE VIRUS TACARIBE. Células Vero se infectaron, o no (A) a m.d.i. = 3 con un "stock" CPE (+) (B, C y D) o un "stock" CPE (-) (E, F y G) de virus Tacaribe. A las 4 (B y E), 12 (C y F) y 24 (D y G) HPI las muestras se procesaron para la detección de antígenos virales totales por el método de inmunofluorescencia indirecta -IFI- (Materiales y Métodos, 12.).

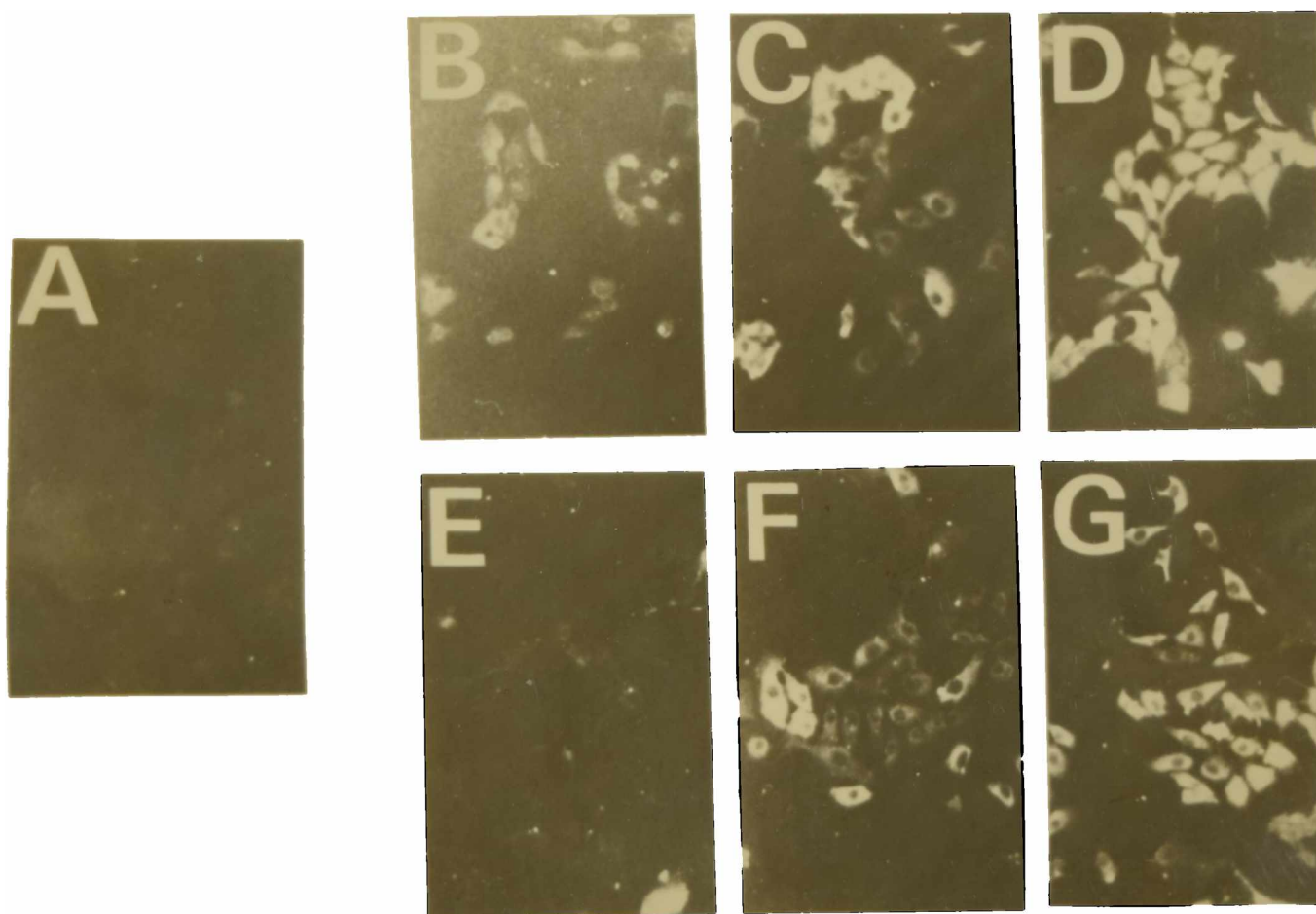
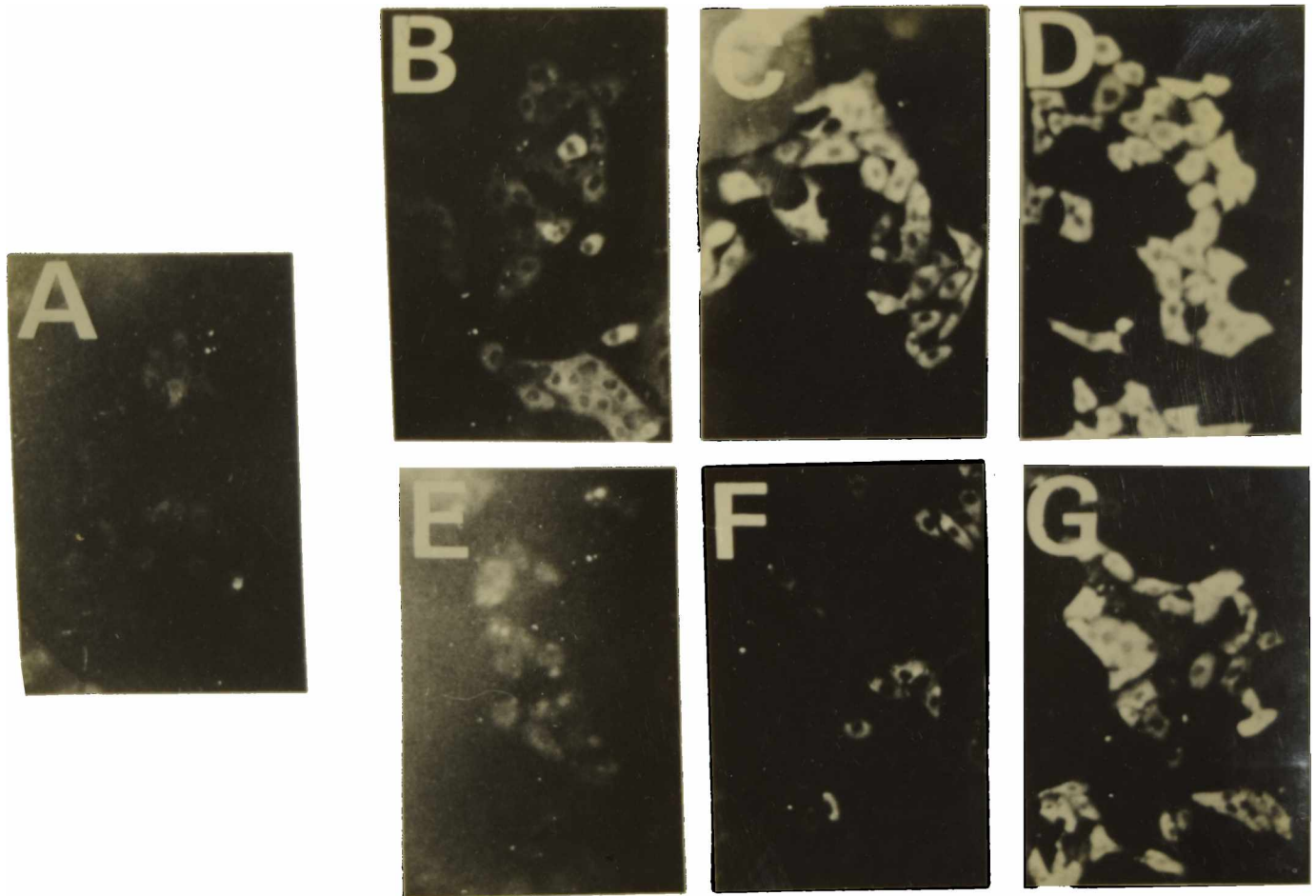


Figura II.6.B. CINETICA DE APARICION DE ANTIGENOS VIRALES DE SUPERFICIE EN CELULAS VERO INFECTADAS CON "STOCKS" CPE (+) Y CPE (-) DE VIRUS TACARIBE. Células Vero se infectaron, o no (A) a m.d.i. = 3 con un "stock" CPE (+) (B, C y D) o un "stock" CPE (-) (E, F y G) de virus Tacaribe. A las 4 (B y E), 12 (C y F) y 24 (D y G) HPI la muestras se procesaron para la detección de antígenos virales de superficie por el método de IFI (Materiales y Métodos, 12.).



el análisis de la eficiencia de infección por IFI a las 8 HPI. En estas condiciones no se supera el período de latencia (ver Introducción) y pueden identificarse claramente por observación a bajo aumento las células inmunofluorescentes. La determinación de la eficiencia de infección con este método se realizó, entonces, a las 8 HPI en células Vero infectadas a distintas multiplicidades con un "stock" CPE (+) de virus Tacaribe. Los resultados obtenidos permiten observar (Fig. II.7.) en primer lugar, una relación directa entre la m.d.i. y la fracción de células inmunofluorescentes. En segundo lugar, se observa que a multiplicidades elevadas todas las células de la monocapa están infectadas; este hecho está de acuerdo con nuestras observaciones anteriores en cuanto a la incapacidad de magnificar el CPE y la inhibición de la síntesis proteica con el aumento de la m.d.i. a multiplicidades mayores o iguales a 3. Es de destacar que a las 8 HPI las células Vero infectadas con "stocks" CPE (-) a m.d.i. elevadas presentan también un 100% de eficiencia de infección. Si se retoma la imagen de la Fig. II.6. puede verse que a m.d.i. = 3, casi todas las células infectadas con un "stock" CPE (-) aparecen inmunofluorescentes.

La eficiencia de infección se determinó además, cuantificando la fracción de células productoras de virus (determinados a las 3 HPI como se indicó en Materiales y Métodos -6-). Esta determinación se llevó a cabo en células Vero infectadas con un "stock" CPE (+) de virus Tacaribe. Con el objeto de estudiar la correlación existente entre la fracción de células inmunofluorescentes y la determinación de CI, los resultados se incluyeron también en la Fig. II.7. En ésta puede observarse una fuerte correlación entre la eficiencia de infección determinada por IFI y por CI. Esto indica que prácticamente todas las células inmunofluorescentes son capaces de producir virus infectivos. Reafirma, además, el resultado obtenido por IFI de que puede lograrse una infección total de la monocapa celular a m.d.i. elevadas. Estos resultados difieren de los descriptos precedentemente por otros autores, donde en ningún caso se obtiene una infec-

Figura II.7. EVALUACION DE LA EFICIENCIA DE INFECCION EN CELULAS VERO POR UN "STOCK" CPE(+) DE VIRUS TACARIBE. Cultivos de células Vero se infectaron con un "stock" CPE(+) de virus Tacaribe a distintas m.d.i. A las 3 HPI parte de los cultivos celulares se procesaron para la determinación de centros infectivos (CI) (Materiales y Métodos, 8.) y los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje de células productoras de virus con respecto al total (■). A las 8 HPI las células restantes se fijaron con acetona y se procesaron para la determinación de antígenos virales por inmunofluorescencia indirecta (Materiales y Métodos, 12.). Las células inmunofluorescentes (IF) se contaron y se refirieron al total de las células en la monocapa (●).

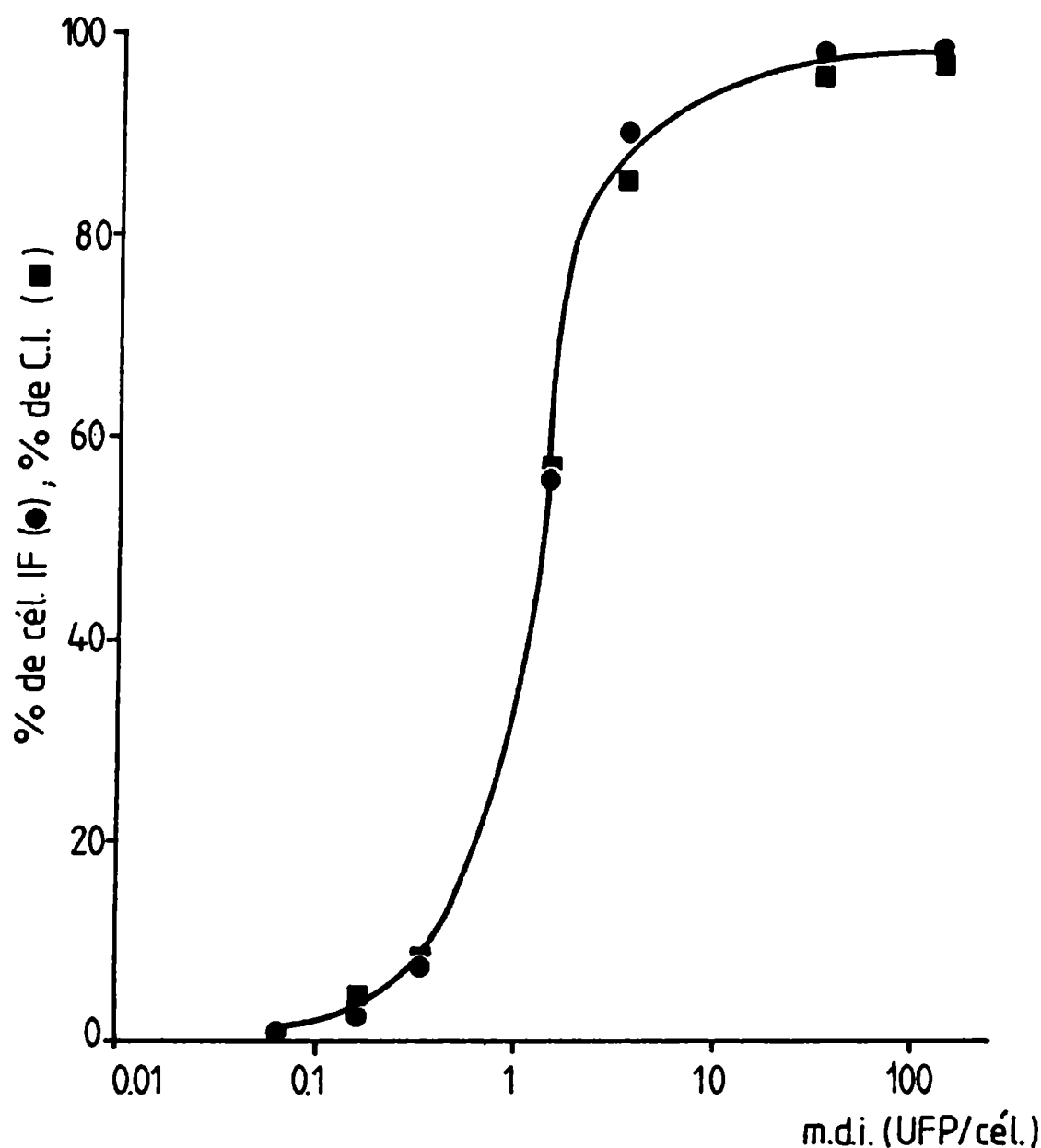
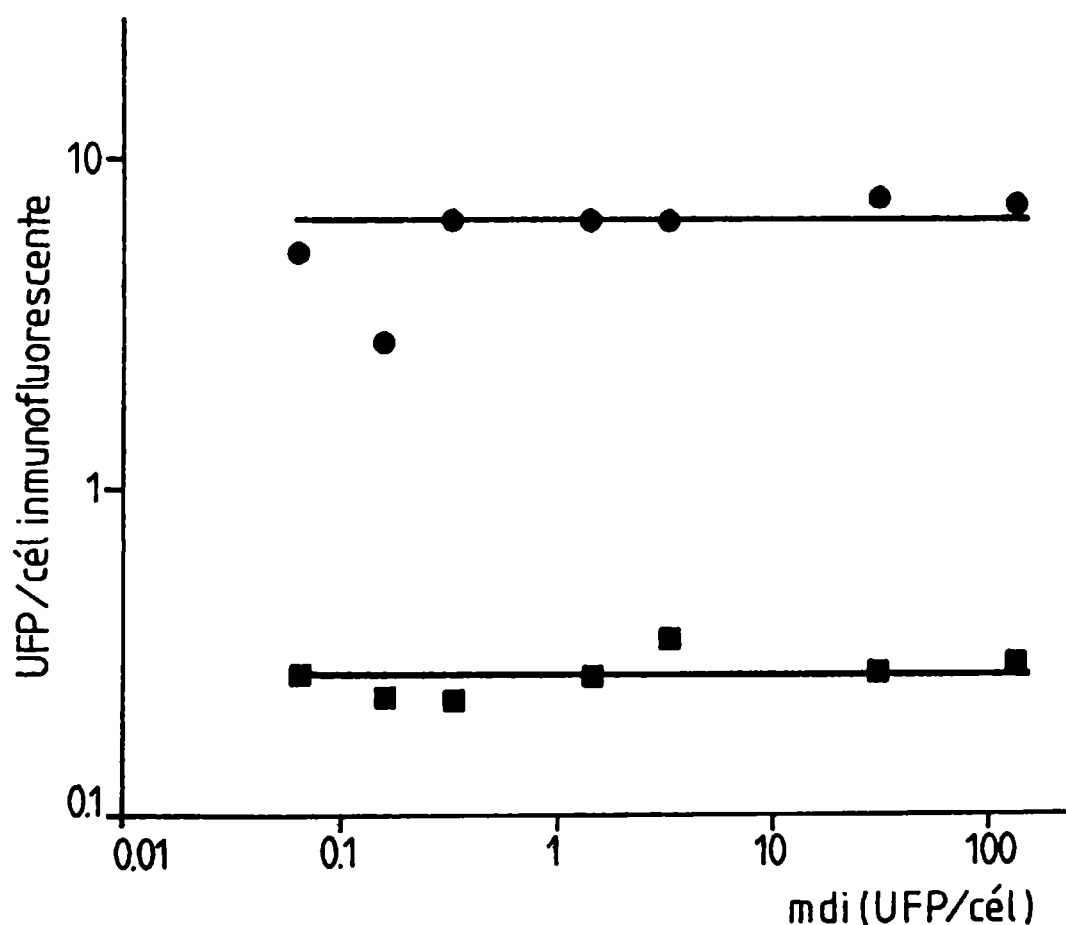


Figura 11.8. ANALISIS DE LA PRODUCCION DE VIRIONES INFECTIVOS POR CELULA INFECTADA. Células Vero fueron infectadas con un "stock" CPE(+) de virus Tacaribe a m.d.i. de 0.06; 0.15; 0.3; 1.5; 3; 30 y 120 UFP/cél. A las 24 HPI se recolectaron los sobrenadantes y las células se desprendieron de la monocapa. Estas últimas fueron sometidas a 3 ciclos frío-calor para liberar las partículas infectivas asociadas a células y fueron tituladas, al igual que los sobrenadantes, por el método de plaqueo en células Vero (Materiales y Métodos, 4.) Por otra parte, células Vero infectadas con las m.d.i. ya indicadas, se fijaron con acetona a las 24 HPI y se procesaron para la detección de antígenos virales por I.F.I. como se indicó en Materiales y Métodos (12.) En cada caso se determinó la fracción de células infectadas (immunofluorescentes) y se representó la producción de VI (UFP) libres por célula infectada (■) y de VI asociados a células por célula infectada (●) para las diferentes m.d.i. ensayadas.



ción total y sincrónica de la monocapa celular. La infección de células Vero con virus Junín a m.d.i. elevadas mostró -por IFI- también una infección total de la monocapa celular (resultados no mostrados).

El hecho de que todas las células inmunofluorescentes (células infectadas) fueran capaces de producir virus infectivos nos proporcionó la posibilidad de determinar la producción de virus infectivos por célula infectada. Para ello se infectaron células Vero a distintas multiplicidades con un "stock" CPE (+) de virus Tacaribe. A las 24 HPI se determinó, por una parte, la fracción de células infectadas (medidas por IFI) y, por otra parte, la producción de virus infectivos (UFP), tanto los asociados a células como los liberados al medio extracelular (Fig. II.8.). Las UFP asociadas a células y las liberadas al medio extracelular a las 24 HPI se expresaron por célula inmunofluorescente. El análisis de estos resultados permite extraer las siguientes conclusiones: a) la producción extracelular de virus infectivos a 24 HPI es extremadamente baja (menos de 1 UFP/cél.); b) la proporción de VI liberados al medio extracelular con respecto a los VI totales (extracelulares + asociados a células) también es baja (menos del 5%); c) la producción de VI por célula infectada es constante e independiente de la m.d.i. utilizada. Este último hecho sugiere que, o existe una limitación en la cantidad de virus infectivos que pueden penetrar a la célula hospedadora o que la capacidad celular para soportar la replicación viral es limitada o bien que el virus posee un mecanismo de control que regula la producción viral.

2. Análisis de las proteínas virales intracelulares.

A pesar de encontrarse descripta la aparición de varias proteínas inducidas por la replicación del virus Tacaribe en células Vero y BHK21 (Boersma y Compana, 1985; Gimenez y col., 1983; Saleh y col., 1979) existen varios hechos que nos indujeron a analizar la síntesis de proteínas generadas durante la replicación de los VI en nuestro sistema:

1) Debido a la falta de inhibición en la síntesis de proteínas en células infectadas con virus Tacaribe, en todos los trabajos previos se recurrió a la inmunoprecipitación de los péptidos virales con antisueros específicos contra proteínas virales o al uso de drogas para inhibir específicamente la síntesis de las proteínas celulares (Boersma y Compana, 1985; Gimenez y col., 1983; Saleh y col., 1979). Es por lo tanto posible, que en el primer caso, se pierdan péptidos no estructurales del virión y que, en el segundo caso, la perturbación introducida en el sistema pueda inducir cambios en el medio intracelular que pudieran afectar la expresión normal del genoma viral. La inhibición de la síntesis de macromoléculas celulares inducidas por los VI durante su replicación en células Vero infectadas con "stocks" CPE (+) de virus Tacaribe nos permite, en cambio, analizar la síntesis de proteínas virales sin necesidad de introducir modificaciones en el sistema virus-célula que podrían conducir a apreciaciones erróneas.

2) La falta de inhibición de la síntesis de macromoléculas celulares observada por los autores mencionados en el punto anterior, sugieren la presencia de partículas DI en la preparación viral, las cuales, evidentemente están afectando la expresión normal de los VI (producción de CPE e inhibición de la síntesis de macromoléculas celulares). Esta modificación en la expresión genética de los VI podría extenderse también a la síntesis de proteínas inducidas por el virus. Por otra parte, debe recalcar aquí que nuestro objetivo básico consiste en analizar, en primer lugar, la replicación normal del virus y recién después, estudiar el fenómeno de interferencia viral.

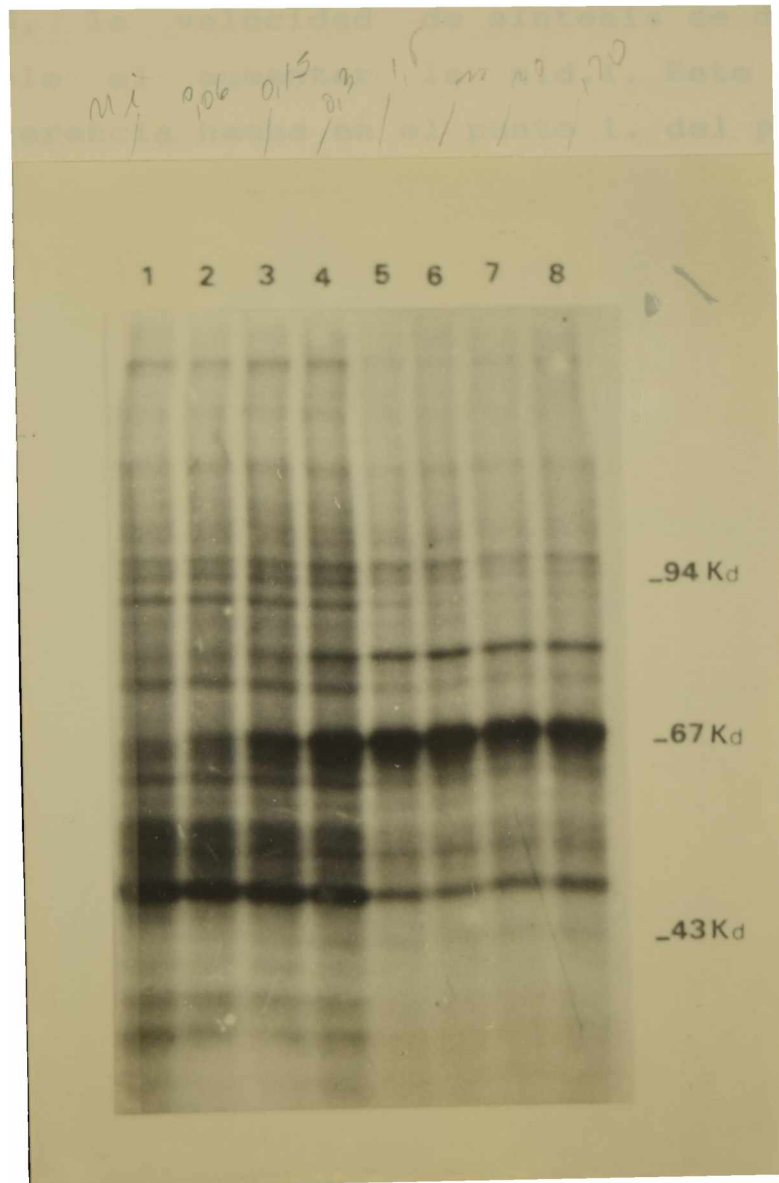
3) Otro aspecto se refiere a la caracterización de los péptidos minoritarios y a su relación con las proteínas estructurales. Por ej. Saleh y col. (1979) describen a la nucleoproteína viral (N) de 68 Kd como un producto primario de la expresión genética del virus. Sin embargo, Compana y col. (1981) describen en el virión aislado un péptido (P) de 77-79 Kd que proponen como posible precursor de la nucleoproteína N. Por otra parte, Gimenez y col., (1983) encuentran en las células infectadas, además

de la nucleoproteína viral, dos proteínas minoritarias de 79 Kd (p79) y 105 Kd (p105); según estos autores, el polipéptido de 79 Kd no está relacionado con la nucleoproteína viral. En último término, Boersma y Compana (1985) describen al péptido P (79 Kd) y a un péptido de 73 Kd (sólo observable mediante marcaciones muy cortas -5 min-) como posibles precursores de la proteína N. Es decir, no se ha aclarado aún qué proteínas son codificadas por el virión y qué relación existe entre ellas.

4) En último término, debe recalcar que no ha sido descrita la síntesis de polipéptidos inducidos por la replicación de virus Tacaribe antes de las 24 HPI. Así, Saleh y col. (1974) detectan la nucleoproteína viral (N) recién entre las 24 y 36 HPI, mientras que pueden observar una glicoproteína de 70 Kd (Gp70), probable precursora de la glicoproteína viral, recién después de las 36 HPI. Por otra parte, Buchmeier y col. (1978) describen la aparición de la nucleoproteína viral en células infectadas con virus LCM, a partir de las 6 HPI, aunque sólo pueden obtener niveles observables de la glicoproteína intracelular GPC después de las 24 HPI. Por último, Harnish y col. (1981) han podido observar, en células infectadas con virus Pichinde la nucleoproteína N y el precursor de la glicoproteína viral (GPC) a partir de las 12 HPI. En todos los casos, los virus han realizado ya varios ciclos replicativos (ver tiempo de generación viral, Cap. I). El hecho de poder lograr infecciones totales y sincrónicas de las monocapas celulares nos coloca en condiciones óptimas para el estudio de los eventos moleculares durante el primer ciclo replicativo.

Siguiendo entonces la propuesta original, intentamos caracterizar la síntesis de los polipéptidos inducidos por la replicación de virus Tacaribe en células Vero. Para ello, dichas células fueron infectadas con un "stock" CPE (+) de virus Tacaribe a diferentes m.d.i., se marcaron durante 1 h con [³⁵S]-metionina (a las 23 HPI) y se analizaron en un gel de poliacrilamida-SDS. El fluorograma obtenido se muestra en la Fig. II.9. Puede observarse en primer lugar, que con m.d.i. = 1,5 (con más de un 90%

Figura 11.9. CARACTERIZACION DE PROTEINAS VIRALES EN CELULAS VERO INFECTADAS CON UN "STOCK" CPE(+) DE VIRUS TACA-RIPE. Células Vero fueron infectadas con un "stock" CPE(+) de virus Tacaribe a diferentes m.d.i. A las 23 HPI las células se marcaron con 20 μ Ci/ml de [35 S]-metionina en medio sin metionina. A las 24 HPI las células fueron desprendidas de la monocapa, disueltas en "buffer" de muestra y procesadas para su análisis en un gel de PAA-SDS 7/15% (Materiales y Métodos, 14.) Se muestra el fluorograma obtenido del análisis de las proteínas de las células no infectadas (línea 1) e infectadas con m.d.i. de 0.06 (línea 2); 0.15 (línea 3); 0.3 (línea 4); 1.5 (línea 5); 3 (línea 6); 30 (línea 7) y 120 (línea 8). A la derecha se indica la posición de patrones de peso molecular.



de células infectadas) la síntesis de proteínas celulares presenta una considerable inhibición. Este hecho permite evidenciar claramente dos proteínas, -que no se observan en las células no infectadas- de 68 Kd y 79 Kd que corresponden respectivamente, a la nucleoproteína viral (N) y al polipéptido p79, descritos por Gimenez y col. (1983).

La cuantificación de la incorporación de radioactividad en las proteínas N y P79 (Tabla II.6.) permite concluir que a m.d.i. $\geq 1,5$, la velocidad de síntesis de dichas proteínas permanece estable al aumentar la m.d.i. Este hecho refuerza aún más la sugerencia hecha en el punto 1. del presente capítulo, de que tal vez exista una limitación en la capacidad celular para soportar la replicación viral, o que la penetración de virus a la célula sea limitada, o bien que el virus posea un mecanismo de autocontrol que regule la producción viral.

Tabla II.6.: CUANTIFICACION DE LA SINTESIS DE PROTEINAS VIRALES EN CELULAS VERO INFECTADAS A DISTINTAS M.D.I. CON UN "STOCK" CPE (+) DE VIRUS TACARIRE.*

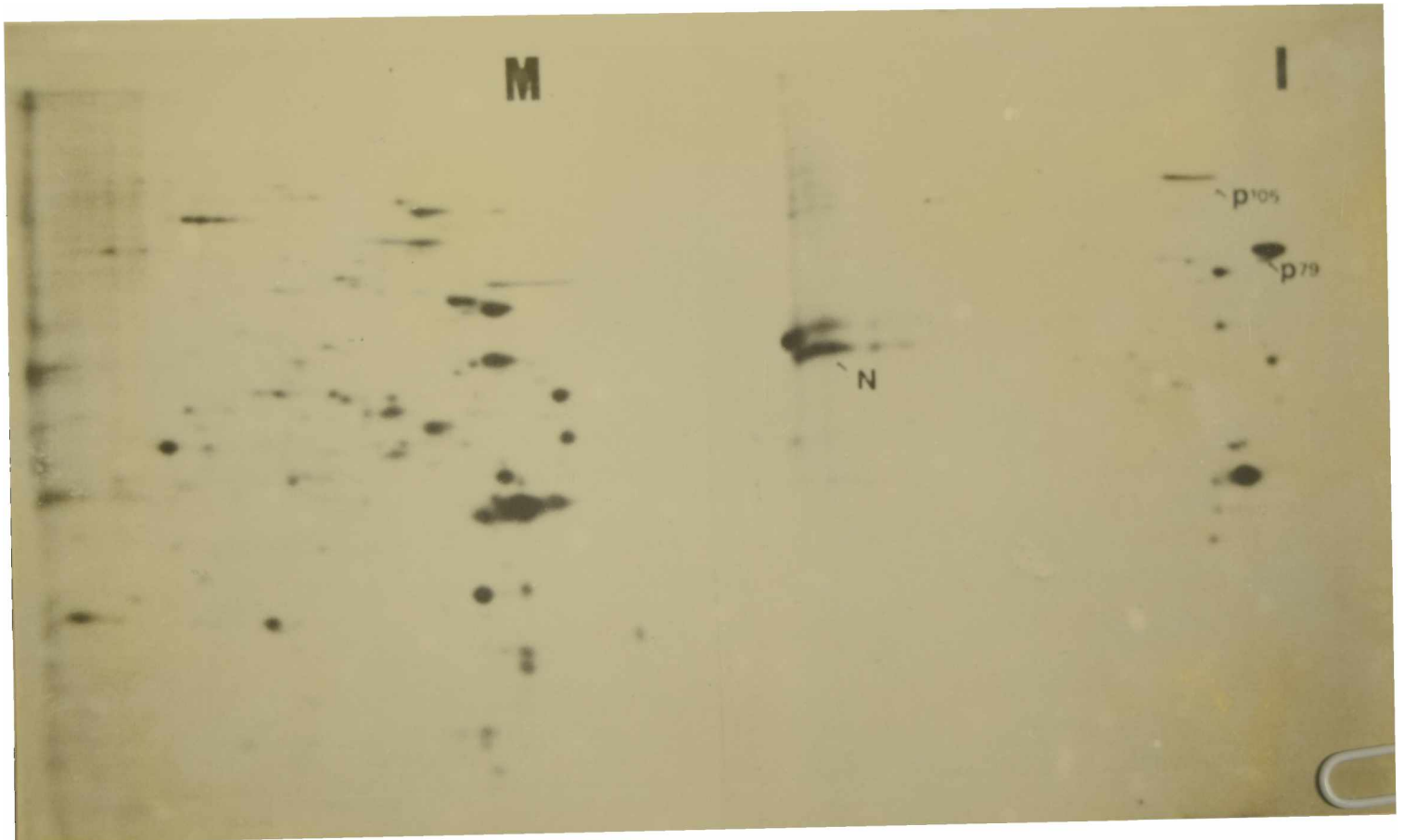
Proteína viral	incorporación (% de N máximo)				
	m.d.i.				
	0.3	1,5	3	30	120
N	34	100*	89	98	92
p79	-	-	6	10	8

* Cada una de las líneas correspondientes a las diferentes m.d.i. (Fig. II.8.) fue separada y cortada en fracciones de 2 mm. Cada una de ellas se procesó como se indica en Materiales y Métodos para cuantificar su radiactividad (14). Se calculó la radiactividad incorporada a los picos correspondientes a las proteínas N y p79 y la cantidad de cada una de ellas se expresó como porcentaje de la radiactividad máxima obtenida para la proteína N.

* La radiactividad en la nucleoproteína viral representa un 26% de la radiactividad total en la muestra.

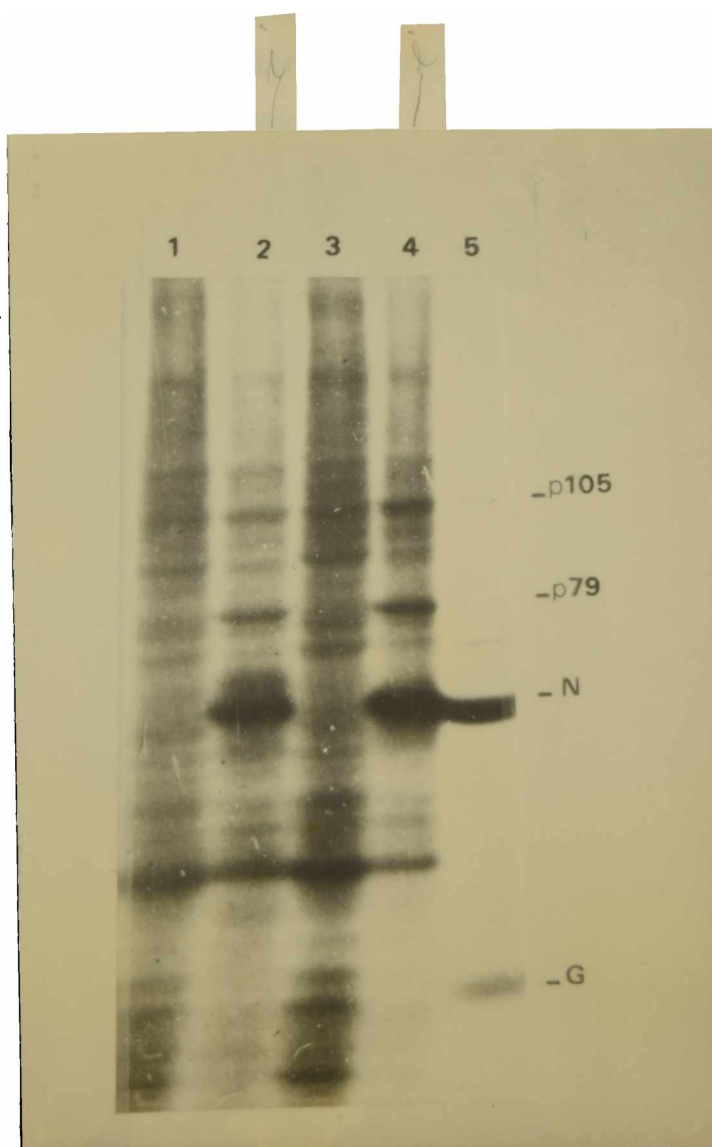
Retornando al análisis de la Fig. II.9., puede observarse, además, un polipéptido de peso molecular 105 Kd que permanece estable frente a la inhibición de la síntesis proteica. Esto podría significar, o bien, que dicha inhibición no afecta por igual a todas las proteínas celulares, o bien, que se sintetiza un polipéptido viral del mismo peso molecular (105 Kd) que la proteína celular cuya síntesis se inhibió. Para aclarar este punto, se decidió caracterizar a la proteína p105 mediante un gel bidimensional (método de O'Farrell, 1975). Para ello se marcaron células Vero infectadas, o no, con un "stock" CPE (+) de virus Tacaribe entre las 20 y las 24 HPI con [³⁵S]-metionina. Las muestras obtenidas a 24 HPI se analizan en dos dimensiones. El fluorograma obtenido para las células infectadas (I) y no infectadas (M) se muestran en la Fig. II.10. En dicha figura puede observarse una neta inhibición en la síntesis de las proteínas celulares; esto permite ver claramente tres proteínas N, p79 y p105 que no aparecen en las células no infectadas. Concluimos, por lo tanto, que las tres son proteínas inducidas por la replicación viral. Por otra parte, el hecho de que las proteínas N y p79 posean un punto isoeléctrico tan diferente, sugiere que estas proteínas no estarían vinculadas en un proceso del tipo precursor-producto. Según se comentó más arriba, Boersma y Compans (1985) han descripto recientemente la aparición de una proteína de 73 Kd a las 70 HPI cuando las células infectadas se marcan por corto tiempo (5 min). Esta proteína es aparentemente procesada para producir la nucleoproteína viral (evidenciado por un "chase" de 2 horas). Con el objeto de verificar esto, seguimos un esquema de trabajo similar al utilizado por estos autores, pero trabajando a 24 HPI de forma de no permitir que el virus sufra demasiados ciclos replicativos y de poder trabajar en el período de máxima inhibición de la síntesis de proteínas celulares (de esta forma evitamos el agregado de NaCl que introducen dichos autores durante la marcación para disminuir el fondo provocado por las proteínas celulares en el fluorograma final). Para ello, células Vero fueron infectadas, o no, con

Figura 11.10. ANALISIS BIDIMENSIONAL DE LAS PROTEINAS VIRALES INTRACELULARES. Células Vero no infectadas (M) e infectadas con un "stock" CPE(+) de virus Tacaribe a m.d.i.= 5 (I) se marcaron entre las 20 y 24 HPI con 200 μ Ci/ml de [35 S]-metionina en medio de cultivo sin metionina. Al finalizar el periodo de marcación las células se resuspendieron en "buffer" de lisis y se procesaron para su análisis bidimensional (Materiales y Métodos, 14.). Se muestran los fluorogramas obtenidos.



un "stock" CPE (+) de virus Tacaribe y marcadas durante 5 min a las 24 HPI con [35 S]-metionina. Otro grupo de células fue tratada de igual manera, pero después de la marcación se realizó un "chase" por 30 min más, eliminando el precursor radiactivo y agregando medio conteniendo pactamicina para evitar la síntesis de nuevas proteínas. Las muestras obtenidas fueron analizadas en un gel de PAA-SDS (Fig. II.11.). En el mismo gel se analizaron las proteínas obtenidas de virus purificados con el objeto de establecer comparaciones. Con el fin de visualizar mejor el precursor de la nucleoproteína, la placa radiográfica debió ser sobreexpuesta, por lo cual no es tan evidente la inhibición de la síntesis proteica en las células infectadas. En la línea 5 correspondiente a las proteínas virales constitutivas, pueden observarse dos bandas mayoritarias: las correspondientes a la nucleoproteína (N) y la glicoproteína (G) que en nuestras manos presentan un peso molecular de 69 Kd y 36 Kd respectivamente. Con una movilidad electroforética menor que la presentada por la proteína N pueden observarse péptidos de peso molecular de 73 Kd, 75 Kd, 79 Kd y 105 Kd que denominaremos p73, p75, p79 y p105 respectivamente. Si analizamos ahora las proteínas marcadas durante el pulso de 5 min, podemos evidenciar en las células infectadas (línea 2) además de las 3 proteínas ya descritas (N, p79 y p105) una proteína de 72-73 Kd que no se observa en las células no infectadas (línea 1). Puede verse en el mismo fluorograma que dicho péptido (p73) desaparece después del "chase" de 30 min (línea 4). Puede observarse, además, que las proteínas p79 y p105 permanecen estables después de dicho "chase", hecho que sugiere que no existe relación precursor-producto entre éstas y la nucleoproteína viral. Consideramos, además, que es posible dicha relación precursor-producto entre la p73 y la proteína N. Por último, la revisión de los trabajos aquí analizados a la luz de nuestros resultados, sugieren que el péptido "P" de 77-79 Kd descrito por Compans y col. (1981) en el virión aislado corresponde al que nosotros denominamos p75 (y que no excluimos que sea de origen celular) y que el

Figura II.11. DETECCION DE PROTEINAS VIRALES DE VIDA MEDIA CORTA. Células Vero crecidas en cajas de Petri de 35 mm fueron infectadas (líneas 2 y 4) o no (líneas 1 y 3) a m.d.i.= 5 con un "stock" CPE(+) de virus Tacariba. A las 24 HPI las células fueron preincubadas durante 30 min en medio de cultivo sin metionina y luego marcadas con 200 μ Ci/ml de [35 S]-metionina. Después de 5 min de marcación, un par de placas de Petri (una de células controles y una de células infectadas) fueron desprendidas y procesadas para el análisis en geles de poliacrilamida-SDS 7/15% como se indica en Materiales y Métodos (14.) (líneas 1 y 2). Otro par de placas, antes de ser desprendidas y procesadas se sometieron a un "chase" de 30 min en medio de cultivo completo con 30 μ g/ml de pactamicina (líneas 3 y 4). Con fines comparativos se analizaron en el mismo gel (línea 5) las proteínas de virus purificados marcados con [35 S]-metionina (Materiales y Métodos, 10.2.). A la derecha se indican las posiciones de las proteínas virales G, N, p79 y p105.



péptido p79 descrito por Gimenez y col. corresponde al p79 que nosotros encontramos marcado fuertemente en las células y debilmente en el virión.

Al igual que numerosos autores (Buchmeier y Oldstone, 1978; Gimenez y col., 1983; Harnish y col., 1981; Saleh y col., 1979) no hemos sido capaces de evidenciar a la glicoproteína viral en las células infectadas por marcación con [^{35}S]-metionina (más adelante se tratará el análisis de esta proteína). El hecho de que esta proteína aparezca marcada con dichos precursores en una proporción importante en el virión liberado al medio extracelular (comparar la proporción de proteína N a G intracelular y viral) sugiere la posibilidad de que pudiese ser un factor limitante en la génesis del virión.

Una vez lograda la caracterización de las proteínas en nuestro sistema, comenzamos el estudio de la secuencia de eventos moleculares analizando la cinética de aparición de proteínas virales intracelulares. Con el fin de aproximarnos al entendimiento del efecto de las partículas DI durante la replicación de los VI, se estudió en paralelo la infección de células Vero con "stocks" CPE (+) y CPE (-). Para ello, células Vero fueron infectadas con ambos tipos de "stocks" utilizando la misma m.d.i. (7 UFP/cél.); en estas condiciones la m.d.i. de partículas DI resultó ser 2 DI/cél. en la infección con el "stock" CPE (-) y menor a 0.001 DI/cél. en la infección con el "stock" CPE (+). En el mismo experimento se analizó la síntesis de proteínas totales (marcación con [^{35}S]-metionina) y glicosiladas (marcación con [^3H]-glucosamina) a diferentes tiempos después de la infección. Los resultados se muestran en las Fig. II.12. y II.13. En la Fig. II.12. se muestra la cinética de aparición de las diferentes proteínas inducidas por el virus en células Vero infectadas con "stocks" CPE (+) y CPE (-), marcadas con [^{35}S]-metionina. Puede verse claramente que en las células infectadas con el "stock" CPE (+) la aparición de las proteínas virales sobre el fondo de las proteínas celulares es más temprana que en las infectadas con el "stock" CPE (-). Así por ej. mientras que la nucleoproteí-

Figura 11.12. CINETICA DE APARICION DE PROTEINAS VIRALES EN CELULAS VERO INFECTADAS CON "STOCKS" CPE(+) Y CPE(-) DE VIRUS TACARIBE. Células Vero fueron infectadas, o no (líneas 1 y 12) con un "stock" CPE(+) (líneas 2,4,6,8 y 10) o con un "stock" CPE(-) de virus Tacaribe (líneas 3,5,7,9 y 11) a m.d.i. = 7. A diferentes tiempos post-infección las células fueron marcadas con 20 μ Ci/ml de [35 S]-metionina por 1 h y procesadas para su análisis en un gel de poliacrilamida-SDS 7/15% (Materiales y Métodos, 14.). Líneas 2 y 3: 4 HPI; líneas 4 y 5: 6 HPI; líneas 6 y 7: 8 HPI; líneas 8 y 9: 12 HPI; líneas 10 y 11: 24 HPI. A la derecha se indica la posición de los marcadores de peso molecular.

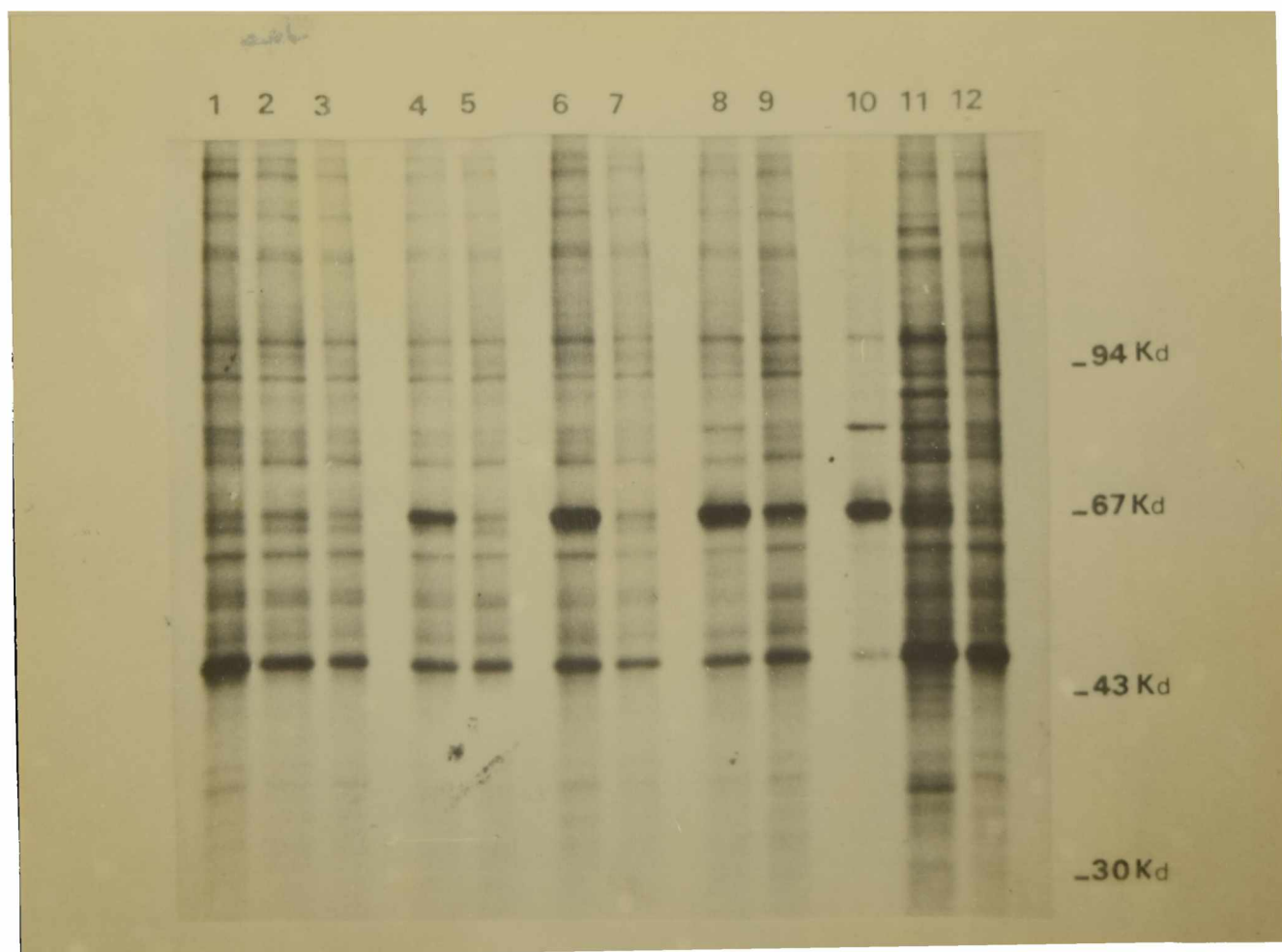
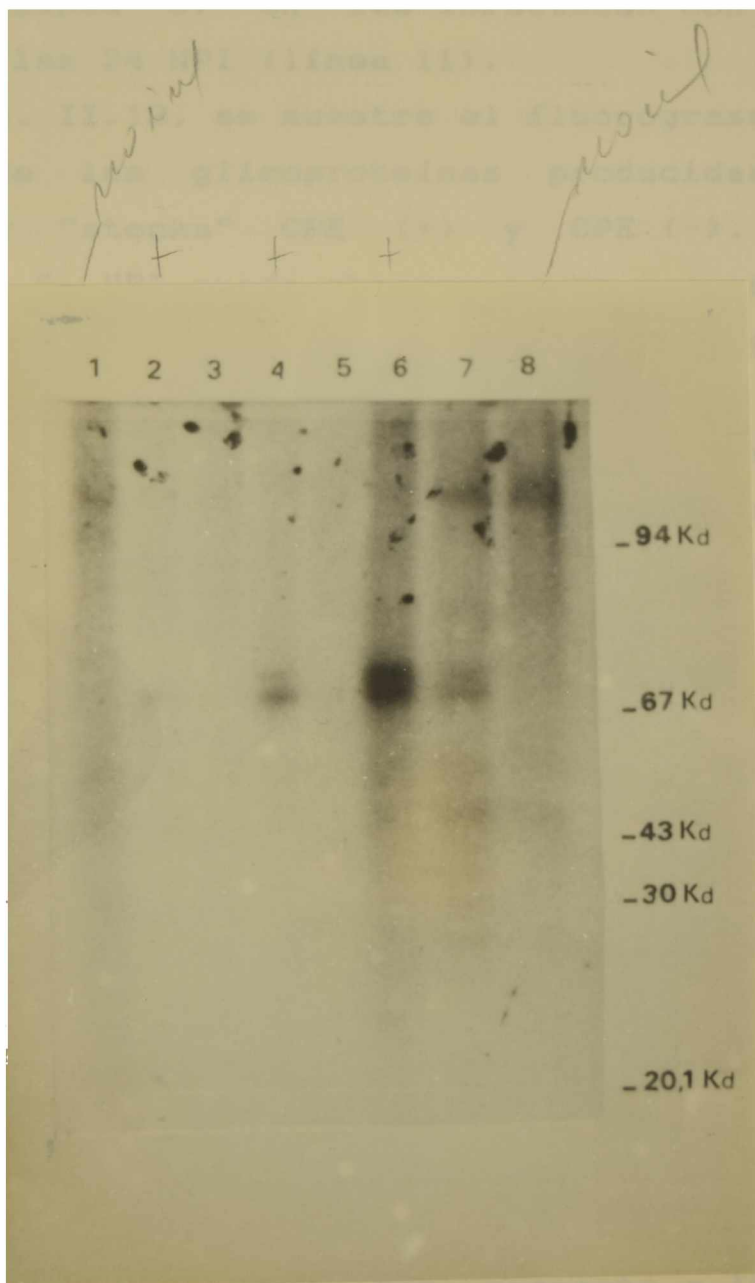


Figura 11.13. CINETICA DE APARICION DE GLICOPROTEINAS VIRALES EN CELULAS VERO INFECTADAS CON "STOCKS" CPE(+) y CPE(-) DE VIRUS TACARIBE. Células Vero fueron infectadas o no (líneas 1 y 8) con un "stock" CPE(+) (líneas 2, 4 y 6) o con un "stock" CPE(-) (líneas 3, 5 y 7) de virus Tacaribe a m.d.i.= 7. A diferentes tiempos post-infección las células se preincubaron por 30 min con medio conteniendo la décima parte de la concentración normal de glucosa y luego se marcaron durante 60 min con 20 μ Ci/ml de [3 H]-glucosamina en el mismo medio de cultivo. A las 6 h (líneas 2 y 3), 12 h (líneas 4 y 5) y a las 24 HPI (líneas 6 y 7), las células fueron desprendidas de la monocapa y procesadas para su análisis en un gel de PAA-SDS 7/15%. A la derecha se indican los pesos moleculares de los patrones de peso molecular utilizados.



na viral se puede observar nítidamente desde las 6 HPI (línea 4) en el primer caso, en células infectadas con el "stock" CPE (-), recién se hace evidente a las 12 HPI (línea 9). Algo similar ocurre con la aparición de la proteína p79; mientras que en células infectadas con el "stock" CPE (+) puede verse desde las 12 HPI (línea 8) en las infectadas con el CPE (-) puede verse recién a las 24 HPI (línea 11).

En la Fig. II.13. se muestra el fluorograma correspondiente al análisis de las glicoproteínas producidas en células Vero infectadas con "stocks" CPE (+) y CPE (-). En primer lugar, ya desde las 6 HPI puede observarse en las células infectadas con el "stock" CPE (+) la síntesis de una glicoproteína de aproximadamente 72 Kd (línea 2), cuya velocidad de síntesis aumenta en función del tiempo post-infección (líneas 4 y 6). En las mismas células, a partir de las 12 HPI se observa la aparición, por encima de la anterior, de una segunda glicoproteína de aproximadamente 75 Kd (línea 4), cuya velocidad de síntesis también se intensifica en función del tiempo. En cuanto a las células infectadas con el "stock" CPE (-), dichas proteínas sólo alcanzan niveles apreciables de síntesis a las 24 HPI. Saleh y col. (1979) describieron previamente una única glicoproteína intracelular de 70 Kd, aparentemente de origen viral, a partir de las 48 HPI. Dichos autores muestran la relación precursor-producto de esta proteína con la glicoproteína viral.

Con respecto a nuestros resultados existen varios aspectos a ser considerados. En primer lugar, es la primera vez que se describe la aparición de proteínas inducidas por la replicación de virus Tacaribe a tiempos tan cortos como 6 HPI, en el caso de la nucleoproteína viral. Con respecto a la aparición de las glicoproteínas, también debe destacarse que para ningún arenavirus ha sido descripta una aparición tan temprana. Por otra parte, en células infectadas con virus Tacaribe no se ha descripto anteriormente más de una banda correspondiente al precursor de la glicoproteína viral -GPC- (Saleh y col., 1979). Sin embargo, un desdoblamiento similar al que describimos nosotros fue

observado para el precursor GPC del virus LCM en células BHK21 infectadas (Buchmeier y col., 1978). Es probable que las dos bandas correspondientes a los polipéptidos glicosilados observados en nuestro sistema (Gp72 y Gp75) representen la presencia de una misma proteína con diferente grado de glicosilación. Por último, debe destacarse que existe una correlación entre la velocidad de síntesis de las proteínas virales (glicosiladas y no glicosiladas) y el nivel de inmunofluorescencia observado cuando se comparan células Vero infectadas con "stocks" CPE (+) con respecto a células infectadas con "stocks" CPE (-). La intensidad de la IFI resultó siempre menor en el último caso.

3. Correlación entre la síntesis de proteínas virales y la inhibición de la síntesis proteica celular con la proporción de DI durante la infección.

Ya analizamos con anterioridad la relación existente entre la proporción de DI durante la infección y su relación inversa con la inhibición de la síntesis proteica y con el desarrollo del CPE (Capítulo II. Parte I.). Por otra parte, se observó (Fig. II.12. y II.13.) que las células Vero infectadas con "stocks" CPE (+) presentan una mayor velocidad de síntesis de proteínas virales que las infectadas con "stocks" CPE (-). Surge entonces en forma inmediata la siguiente pregunta: ¿Existe alguna relación entre la velocidad de la síntesis de las proteínas virales y el desarrollo de la inhibición de la síntesis proteica y del CPE? Para contestar esta pregunta decidimos analizar la posible correlación entre la velocidad de síntesis de las proteínas virales y la inhibición de la síntesis proteica de las células hospedadoras -ya se demostró antes la correlación entre este último efecto y el desarrollo del CPE-. Con este fin, se infectaron, o no, células Vero (m.d.i. = 20 UFP/cél.) en presencia de proporciones variables de partículas DI. A las 25 HPI se marcaron las células con [³⁵S]-metionina y a las 26 HPI -cuando el efecto inhibitorio producido por un "stock" con una baja proporción de DI es máximo- las células fueron desprendidas

de la monocapa y sus proteínas analizadas mediante un gel de poliacrilamida -SDS. En el fluorograma correspondiente (Fig. II.14.) puede observarse que existe correlación entre el grado de inhibición de la síntesis de proteínas celulares y la velocidad de síntesis de las proteínas virales y que esto, por otra parte, depende de la proporción de DI en el "stock" de virus utilizado en la infección. La cuantificación de la radiactividad incorporada en la nucleoproteína viral (N) y en la actina (A) -proteína celular con mayor velocidad de síntesis- permite observar con mayor claridad dicha correlación (Fig. II.15.). Puede verse, además, que el efecto protector de las DI es máximo cuando prácticamente todas las células de la monocapa han sido infectadas con, por lo menos, una DI/célula (≥ 3 DI/cél). Es decir que una DI/célula es suficiente para reducir el nivel de síntesis de, por lo menos, la nucleoproteína viral y para evitar la inhibición de la síntesis de proteínas celulares. Debe destacarse que a pesar de que ya había sido descrita la disminución de velocidad de síntesis de la nucleoproteína de LCM en células BHK₂₁ (Welsh y Buchmeier, 1979), esta es la primera vez que se muestra la correlación entre la protección de la inhibición de la síntesis proteica y el nivel de síntesis de la nucleoproteína viral.

CONCLUSIONES

En el presente capítulo se analizaron distintos aspectos de la interacción entre el virus Tacaribe y las células Vero utilizadas como hospedadoras. Como ya se comentó repetidamente, ciertas consideraciones nos llevaron a suponer que la incapacidad de los arenavirus para inducir la producción de CPE y generar la inhibición de la síntesis de macromoléculas celulares en infecciones con alta m.d.i., podría estar relacionada con la presencia de partículas DI. Debido a esto, nos dedicamos en primer lugar, a encontrar las condiciones óptimas para obtener "stocks" virales con una baja proporción de DI y "stocks" virales

Figura 11.14. EFECTO DE LA PROPORCION DE PARTICULAS DI DE VIRUS TACARIBE EN LA SINTESIS DE PROTEINAS VIRALES INTRA-CELULARES. Células Vero fueron infectadas con mezclas de proporciones variables de "stocks" CPE(+) y CPE(-) de forma de mantener la m.d.i. constante (20 UFP/cél.) y poder modificar la proporción de DI/cél. A las 25 HPI las células se marcaron con 20 μ Ci/ml de [35 S]-metionina en medio sin metionina. A las 26 HPI las células fueron desprendidas de la monocapa, disueltas en "buffer" de muestra y procesadas para su análisis en un gel de PAA-SDS 7/15% (Materiales y Métodos, 14.). Células no infectadas (línea 1); células infectadas con m.d.i. = 20 UFP/cél. y menos de 0.01 DI/cél. (línea 2); 0.2 DI/cél. (línea 3); 1 DI/cél. (línea 4); 2 DI/cél. (línea 5); 5 DI/cél. (línea 6) y 20 DI/cél. (línea 7). A la derecha se indican las posiciones de las proteínas virales N, p79 y p105 y de la actina celular (A).

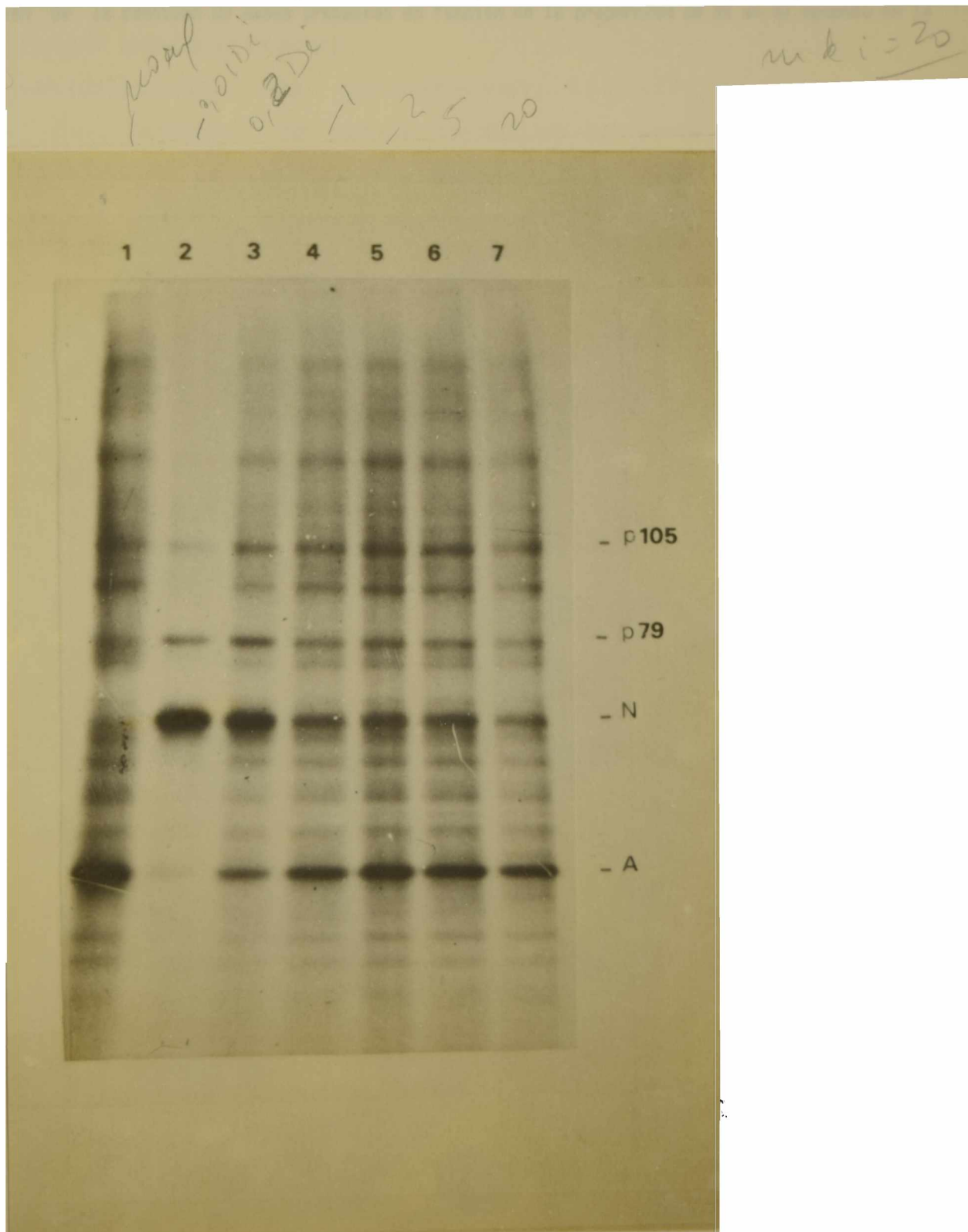
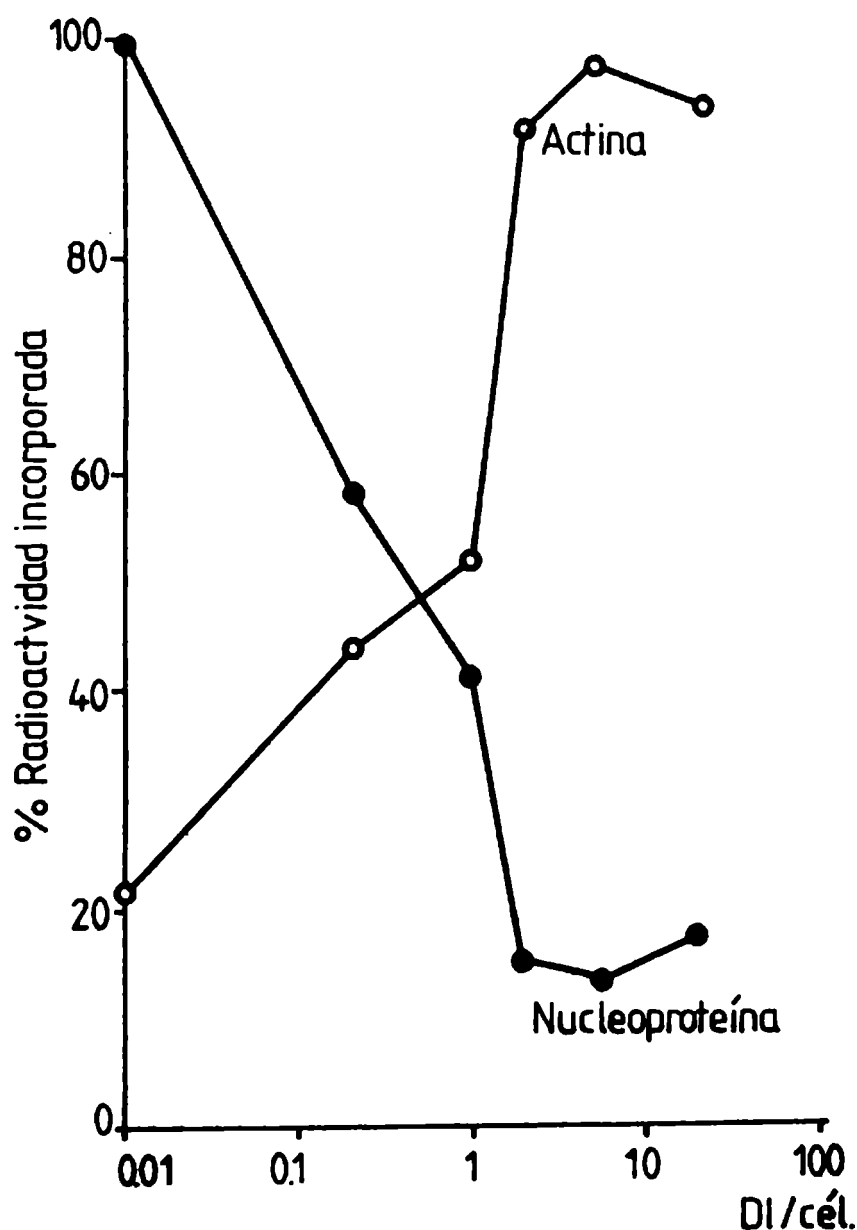


Figura II.15. RELACION ENTRE LA PROTECCION DE LA INHIBICION DE LA SINTESIS PROTEICA CELULAR Y LA DISMINUCION DE LA VELOCIDAD DE SINTESIS DE LA NUCLEOPROTEINA VIRAL. Una vez obtenido el fluorograma de la figura anterior (II.14) cada una de las líneas correspondientes a cada muestra fue cortada en fracciones de 2 mm que fueron digeridas y procesadas para determinar su contenido en radiactividad (Materiales y Métodos, 14.). En cada caso se cuantificó la radiactividad incorporada en los picos correspondientes a la nucleoproteína viral (N) y a la actina celular (A). La cantidad de proteína N se expresó como porcentaje de la incorporación máxima en dicha proteína, correspondiente a las células infectadas con un "stock" CPE(+) (calle 2). La cantidad de actina se calculó como el porcentaje de la incorporación máxima en dicha proteína, correspondiente a las células no infectadas (calle 1). En la figura se analiza la variación de la cantidad de ambas proteínas en función de la proporción de DI en el momento de la infección.



con una alta proporción de DI. Tal vez el hecho más destacado de este trabajo resulta el haber demostrado, por primera vez, que un arenavirus produce CPE e inhibición de la síntesis de macromoléculas en células Vero infectadas con un "stock" libre de partículas DI ($< 10^{-4}$ DI/UFP) a m.d.i. elevadas. La caracterización biológica y bioquímica de este sistema nos permitió obtener las siguientes conclusiones:

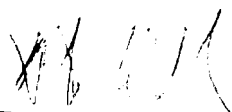
- 1) Se han establecido, por primera vez, las condiciones para la obtención de "stocks" de virus Tacaribe capaces de producir lisis neta en células Vero infectadas con alta multiplicidad de infección. En estas condiciones fue posible demostrar que los arenavirus son capaces de inhibir la síntesis de macromoléculas celulares.
- 2) Se demostró que la replicación de las partículas virales infectivas son las responsables de la inhibición de la síntesis de macromoléculas celulares y de producir el efecto citopático.
- 3) Se demostró que las partículas defectivas interferentes protegen a las células del efecto citopático y de la inhibición de la síntesis proteica provocada por los virus infectivos, sin provocar una disminución significativa en la producción de virus infectivos.
- 4) Se ha demostrado que el virus Tacaribe es capaz de provocar una infección total de la monocapa celular, siendo todas las células infectadas productoras de virus, es decir, se han conseguido infecciones altamente eficientes y productivas.
- 5) Se han caracterizado las proteínas del virus Tacaribe, tanto en las células infectadas como en el virión aislado. En las primeras se observó la nucleoproteína (N) de 68 Kd y un probable precursor de la misma de 73 Kd; dos proteínas de 105 y 79 Kd (p105 y p79), que aparentemente no presentan relación precursor-producto entre ellas y con la nucleoproteína. Utilizando glucosamina radiactiva se detectaron dos glicoproteínas de 72 y 75 Kd que podrían ser precursoras de la glicoproteína viral. En el virión se encontraron, además de los polipéptidos mayoritarios (la nucleoproteína viral -N- de 68 Kd y la glicoproteína viral

-G- de 38 Kd), cuatro polipéptidos minoritarios de 73, 75, 79 y 105 Kd (p73, p75, p79 y p105). Debe destacarse, además, que es la primera vez que se detecta la aparición tan temprana de proteínas de origen viral en células infectadas (6 HPI, la nucleoproteína N y la glicoproteína Gp72; 12 HPI la proteína p79 y la glicoproteína Gp75).

6) La infección de células Vero con "stocks" CPE (-) permitió observar una menor velocidad de síntesis de las proteínas específicas virales, con respecto a las infectadas con "stocks" CPE (+). Se demostró luego, que el aumento en la proporción de DI en el momento de la infección provoca una disminución en la velocidad de síntesis de dichas proteínas virales.

Durante el desarrollo del presente trabajo se han mostrado algunas de las características más salientes de nuestro sistema biológico (sólo detectables bajo un estricto control y manejo sistemático del mismo). Hemos logrado obtener y caracterizar "stocks" virales capaces de producir infecciones líticas (CPE (+)) o persistentes (CPE (-)), pudiendo lograr con ambos tipos de "stocks" infecciones altamente eficientes y productivas. Esto nos coloca en una situación óptima para el estudio de los eventos moleculares que se producen durante una infección lítica o durante el establecimiento de una infección persistente. Se mostró, también, el resultado de los estudios preliminares realizados con ese fin, respecto a la síntesis de proteínas virales. Con el objeto de realizar un análisis completo del sistema, nuestro grupo de trabajo se encuentra actualmente abocado al estudio de los ARNs virales intracelulares. Para ello disponemos de varios cADNs, correspondientes a los ARNs L y S de virus Tacaribe obtenidos por la Dra. Franze-Fernández en el Instituto Pasteur de París (Francia). Han sido obtenidos clones bacterianos portadores de cADNs de la cadena S completa del ARN de virus Tacaribe. Se obtuvieron, además, clones con insertos de cADN con la información genética parcial de los segmentos de ARN que codifican para la síntesis de la proteína N, por un lado y de la proteí-

na G, por el otro. Se ha logrado, además, clonar aproximadamente un tercio del genoma del ARN L de virus Tacaribe. Los mencionados clones están siendo utilizados como sondas para analizar, mediante el método de hibridación molecular, la aparición secuencial de los ARNs mensajeros sintetizados a partir de la cadena S del ARN viral en células Vero infectadas con "stocks" CPE (+) de virus Tacaribe. La aplicación de esta metodología al estudio de los ARNs intracelulares, junto al análisis bidimensional de proteínas en geles de poliacrilamida, constituye una importante herramienta para el estudio secuencial de los diferentes eventos moleculares implicados en el mecanismo de replicación de los virus infectivos, el establecimiento de la persistencia viral y los diferentes aspectos de la interacción virus-célula.



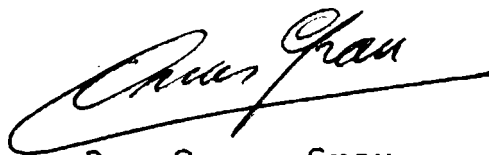
Lic. Ricardo López

Autor



Dra. María T. Franze-Fernández

Directora



Dr. Oscar Grau

Asesor Científico

BIBLIOGRAFIA

- Abelaon, H.T.; Smith, G.H.; Hoffman, H.A. and Rowe, W.P. (1969) "Use of enzyme-labeled antibody for electron microscope localization of LCM virus antigens in infected cell cultures". J. Natl. Cancer Inst. 42, 497.
- Añón, M.C.; Grau, O.; Marínez Segovia, Z. and Franze-Fernández, M.T. (1976) "RNA composition of Junin virus". J. Virol. 18, 833.
- Armstrong, C. and Lillie, R.D. (1934) "Experimental lymphocyte choriomeningitis of monkeys and mice produced by a virus encountered in studies of the 1933 St. Louis encephalitis epidemic". Public Health Reports 49, 1019.
- Auperin, D.D., Galinski, M. and Bishop, D.H.L. (1984a) "The sequences of the N protein gene and intergenic region of the S RNA of Pichinde arenavirus". Virology 134, 208.
- Auperin, D.D., Romanowski, V.; Galinski, M. and Bishop, D.H.L. (1984b) "Sequencing studies of Pichinde arenavirus S RNA indicate a novel coding strategy, ambisense viral S RNA". J. Virol. 52, 897.
- Banerjee, S.N., Buchmeier, M. and Rawls, W.E. (1975/76) "Requirement of cell nucleus for the replication of an arenavirus". Intervirology 6, 190.
- Barsky, G. and Cornefert, F. (1962) "Response of different mouse cell strains to polyoma infection "in-vitro": latency and self-inhibition effect in infected cultures". J. Natl. Cancer Inst. 28, 823.
- Beltz, G.A. and Flint, S.J. (1979) "Inhibition of HeLa cell protein synthesis during adenovirus infection". J. Molec. Biol. 131, 353.
- Boersma, D.P. and Compans, R.W. (1985) "Synthesis of Tacaribe virus polypeptides in an in vitro coupled transcription and translation system". Virus Research 2, 195.
- Bonner, W.M. and Laskey, R.A. (1974) "A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels". Eur. J. Biochem. 46, 83.
- Boxaca, M.C. (1970) "Establecimiento y características de una sublínea de células Vero persistentemente infectadas con virus Junín". Medicina (B. Aires) 30, 50.
- Boxaca, M.C.; Savy, V.L. y Giovanello O.A. (1972) "Células Vero persistentemente infectadas con virus Junín". Medicina (B. Aires) 32, 269.

- Bruton, C.J. (1976) "Defective interfering particles of Semliki Forest virus. Intracellular events during interference". J. Gen. Virol. 31, 397.
- Bruton, C.J. and Kennedy, S.I.T. (1976) "Defective interfering particles in Semliki Forest virus: structural differences between standard virus and defective interfering particles". J. Gen. Virol. 31, 383.
- Buchmeier, M.J.; Elder, J.H. and Oldstone, M.B.A. (1978) "Protein structure of lymphocytic choriomeningitis virus: identification of the virus structural and cell associated polypeptides". Virology 89, 133.
- Buchmeier, M.J. and Oldstone, M.B.A. (1978) "Identity of the viral protein responsible for serologic cross reactivity among the Tacaribe complex arenavirus". In: Negative Strand Viruses and the Host Cell (B.W.J. Mahy and R.D. Barry, eds.) pp. 91, Academic Press, New York.
- Buchmeier, M.J. and Oldstone, M.B.A. (1979) "Protein structure of lymphocytic choriomeningitis virus: evidence for a cell-associated precursor of the virion glycopeptides". Virology 99, 111.
- Buck, L.L. and Pfau, C.J. (1969) "Inhibition of lymphocytic choriomeningitis virus replication by actinomycin D and 6-azauridine". Virology 37, 698.
- Buckley, S.M. and Casals, J. (1970) "Lassa fever a new virus disease of man from West Africa. III. Isolation and characterization of the virus". Am. J. Trop. Med. Hyg. 19, 680.
- Burns, M.; Martínez-Peralta, L. and Lehman-Grube, F. (1983) "Lymphochoriomeningitis virus. III. Structural proteins of the virion". J. Gen. Virol. 64, 599.
- Calisher, C.H.; Tzianabos, T., Lord, R.D. and Coleman, P.H. (1970) "Tamiami virus, a new member of the Tacaribe group". Am. J. Trop. Med. Hyg. 19, 520.
- Carrasco, L. and Smith, A.E. (1980) "Molecular biology of animal virus infection". Pharmac. Ther. 9, 311.
- Carter, M.F.; Biswal, N. and Rawls, W.E. (1973a) "Characterization of the nucleic acid of Pichinde virus". J. Virol. 11, 61.
- Carter, M.F.; Murphy, F.A.; Brunschwig, J.P.; Noonan, C. and Rawls, W.E. (1973b) "effects of Actinomycin D and ultra-violet an ionizing radiation on Pichinde virus". J. Virol. 12, 33.
- Casals, J.; Buckley, S.M. and Cedeno, R. (1975) "Antigenic properties of the arenaviruses". Bull. WHO 52, 421.

- Clegg, J.C.S. and Lloyd, G. (1983) "Structural and cell-associated proteins of Lassa virus". *J. Gen. Virol.* 64, 1127.
- Cole, C.N.; Smoler, D.; Wimmer, E. and Baltimore, D. (1971) "Defective interfering particles of Poliovirus. I. Isolation and physical properties". *J. Virol.* 7, 478.
- Compans, R.W. and Bishop, D.H.L. (1985) "Biochemistry of Arenaviruses". In *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Vol. 114. Springer-Verlag Berlin - Heidelberg. pp.153.
- Compans, R.W.; Boersma, D.P., Cash, P.; Clerx, J.P.M.; Gimenez, H.B.; Kirk, W.E.; Peters, C.J.; Vezza, A.C. and Bishop, D.H.L. (1981) "Molecular and genetic studies of Tacaribe, Pichinde and Lymphocytic choriomeningitis virus". In: Bishop, D.H.L. and Compans, R.W. (eds). *Replication of negative strand viruses*. Elsevier. New York, pp. 31.
- Coto, C.E.; Help, G.I. and Tzaczewski, L.Z. (1972) "Biological properties of Junin virus purified from infected mouse brain". *Medicina (B. Aires)* 32, 281.
- Coto, C.E. and Vomberger, M.D. de (1969) "The effect of 5-Iododeoxyuridine and Actinomycin D on the multiplication of Junin virus". *Arch. Ges. Virusforschung* 27, 307.
- Coto, C.E.; Vomberger, M.D. de; Tzaczewski, L.Z. (1970) Interacción del virus Junín con células de riñón de mono". *Medicina (B. Aires)* 30 (Supl.1), 38.
- Dalton, A.J.; Rowe, W.P.; Smith, G.H.; Wilsnack, R.W. and Pugh, W.E. (1968) "Morphological and cytochemical studies on LCM virus". *J. Virol.* 2, 1465.
- Damonte, E.B.; Calello, M.A.; Weissenbacher, M.C. and Coto, C.E. (1981) "Effect of different temperatures on the preservation of Tacaribe virus infectivity". *Rev. Argent. Microbiol.* 13, 49.
- Damonte, E.B.; Mersich, S.E. and Coto, C.E. (1983) "Response of cells persistently infected with arenaviruses to superinfection with homotypic and heterotypic viruses". *Virology* 129, 474.
- De Mitri, M.I. and Martínez-Segovia, Z.M. (1985) "Polypeptide synthesis in Junin virus-infected BHK₂₁ cells". *Acta Virol.* 29, 97.
- Detjen, B.M.; Walden, W.E. and Thach, R.E. (1982) "Translational specificity in reovirus-infected mouse fibroblasts". *J. Biol. Chem.* 257, 9855.

Dimock, K; Harnish, D.G.; Sisson, G.; Leung, W.C. and Rawls, W.E. (1982) "Synthesis of virus-specific polypeptides and genomic RNA during the replicative cycle of Pichinde virus". J. Virol. 43, 273.

Downs, W.G.; Anderson, C.R.; Spence, L; Aitken, T.H.G. and Greenhall, A.H. (1962) "Tacaribe virus, a new agent isolated from antebiosis bats and mosquitoes in Trinidad, West Indies". Am. J. Trop. Med. Hyg. 12, 640.

Dutko, F.J.; Helfand, J. and Pfau, C.J. (1978) "The RNAs of standard on defective interfering Parana virus". Abstracts for Annual Meeting of American Society for Microbiology.

Dutko, F.J.; Kennedy, S.I.T. and Oldstone, M.B. (1981) "Genome structure of lymphocytic choriomeningitis virus: Complementary termini" En: "The Replication of Negative Strand Viruses" (D.H.L. Bishop and R.W. Compans, eds.) Elsevier, New York, pp. 43.

Dutko, F.J. and Pfau, C.J. (1978) "Arenaviruses defective interfering particles mask the cell-killing potential of standard virus". J. Gen. Virol. 38, 195.

Dutko, F.J.; Wright, E.A. and Pfau, C.J. (1976) "The RNA's of defective interfering Pichinde virus". J. Gen. Virol. 31, 417.

Enea, V. and Zinder, N.D. (1975) "A deletion mutant of bacteriophage ϕ_1 containing no intact cistrons". Virology 68, 105.

Erwin, B.G.; Stoscheck, C.M. and Florini, J.R. (1980) "A rapid fluorometric method for the estimation of DNA in cultured cells. Analytical Biochem. 110, 291.

Falkenthal, A. and Lengyel, J.A. (1981) "Measurement of nucleotide pool specific activities by an in vivo method: comparison with an in vitro method". Biochemistry 20, 312.

Farber, F.E. and Rawls, W.E. (1975) "Isolation of ribosome-like structure from Pichinde virus". J. Gen. Virol. 26, 21.

Fenner, F.; Mc Auslan, B.R.; Mims, C.A.; Sombrook, J. and White, D.D. (1974) "The biology of animal viruses". Academic Press, New York.

Fourth Report of the International Committee for Taxonomy of viruses (1982). Intervirology 17, 119.

Frame, J.E.; Baldwin, J.M.; Gocke, D.J. and Troup, J.M. (1970) "Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. 1. Clinical description and pathological findings". Ann. J. Trop. Med. Hyg. 19, 670.

Fleck, A. and Munro, H.N. (1962) "The precision of ultraviolet absorption measurement in the Schmidt-Thannhauser procedure for nucleic acid estimation". *Biochem. Biophys. Acta* 55, 571.

Friedman, R.M. and Romseur, J.M. (1979) "Mechanisms of persistent infections by cytopathic viruses in tissue culture". *Arch. Virol.* 60, 83.

Gangemi, J.D.; Rosato, R.R.; Connell, E.V.; Johnson, E.M. and Eddy, G.A. (1978) "Structural polypeptides of Machupo virus". *J. Gen. Virol.* 41, 183.

Gard, G.P.; Vezza, A.C.; Bishop, D.H.L. and Compans, R.W. (1977) "Structural proteins of Tacaribe and Tamiani virions". *Virology* 83, 84.

Garry, R.F.; Bishop, J.M.; Parker, S.; Westbrook, K.; Lewis, G. and Waite, M.R.F. (1979) "Na⁺ and K⁺ concentrations and the regulation of protein synthesis in Sindbis virus-infected chick cells". *Virology* 96, 108.

Gimenez, H.B.; Boersma, D.P. and Compans, R.W. (1983) "Analysis of polypeptides in Tacaribe virus-infected cells". *Virology* 128, 469.

Gonsalez, J.P.; Mc Cormick, J.B.; Saluzzo, J.F.; Herve, J.P.; Georges, A.J. and Johnson, K.M. (1983) "An arenavirus isolated from wild-caught rodents (*Praomys* species) in the Central African Republic". *Intervirology* 19, 105.

Gould, E.A. and Linton, P.E. (1975) "The production of a temperature-sensitive persistent measles virus infection". *J. Gen. Virol.* 28, 21.

Gachwender, H.H.; Brummund, M. and Lehman-Grube, F. (1975) "Lymphocytic choriomeningitis virus. I. Concentration and purification of the infectious virus". *J. Virol.* 15, 1317.

Grau, O.; Franze-Fernández, M.T.; Romanowski, V.; Rustici, S.M. and Rosas, M.F. (1981) "Junin virus structure" In: *Negative Strand Viruses* (David H.L. Bishop and Richard W. Compans, eds.) Elsevier North Holland, Inc., pp. 11.

Harnish, D.H.G.; Dimock, K.; Bishop, D.H.L. and Rawls, W.E. (1983) "Gene mapping in Pichinde virus: assignment of viral polypeptides to genomic L and S RNAs". *J. Virol.* 46, 638.

Harnish, D.H.G.; Leung, W.C. and Rawls, W.E. (1981) "Characterization of polypeptides immunoprecipitable from Pichinde virus infected BHK21 cells". *J. Virol.* 38, 840.

- Helentjaris, T. and Ehrenfeld, E. (1978) "Control of protein synthesis in extracts from poliovirus-infected cells. I. mRNA discrimination by crude initiation factors". *J. Virol.* 26, 510.
- Help, G.I.; Leon, M.E. y Coto, C.E. (1976) "Interferencia asociada a los cultivos crónicamente infectados con virus Junín". *Rev. Asoc. Arg. Microbiol.* 8, 45.
- Help, G.I. y Coto, C.E. (1980) "Génesis de partículas interferentes durante la multiplicación del virus Junín in vivo". *Medicina (B. Aires)* 40, 531.
- Holmes, K.V. and Choppin, P.W. (1966) "On the role of the response of the cell membrane in determining virus virulence. Contrasting effects of the parainfluenza virus SV5 in two cell types". *J. Exp. Med.* 124, 501.
- Hotchin, J. (1971) "Persistent and slow virus infections". Monographs in Virology 3, 5. S. Karger, Basel.
- Holland, J.J. and Villareal, L.P. (1974) "Persistent noncytotoxic vesicular stomatitis virus infection mediated by defective T particles that suppress virion transcriptase". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 2956.
- Holland, J.J.; Villareal, L.P. and Breindl, M. (1976) "Factors involved in the generation and replication of Rhabdovirus defective T particles". *J. Virol.* 17, 805.
- Holland, J.J.; Villareal, L.P.; Welsh, R.M.; Oldstone, M.B.A.; Kohne, D.; Lazzarini, R. and Scolnick, E. (1976) "Long term persistent vesicular stomatitis virus and rabies infection of cells in vitro". *J. Gen. Virol.* 33, 193.
- Horzinek, M.C. (1975) "Kompendium der allgemeinen virologie". Paul Parey (Ed.) Berlin und Hamburg.
- Howard, C.R. and Simpson, D.I.H. (1980) "The biology of the arenaviruses". *J. Gen Virol.* 51, 1.
- Huang, A.S. (1973) "Defective interfering viruses". *Annu. Rev. Microbiol.* 27, 101.
- Huang, A.S. and Baltimore, D. (1970) "Defective viral particles and viral disease processes". *Nature* 226, 325.
- Huang, A.S.; Greenawalt, J.M. and Wagner, R.R. (1966) "Defective T particles of vesicular stomatitis virus. I. Preparation, morphology and some biological properties". *Virology* 30, 161.

- Huang, A.S. and Palma, E.L. (1974) "Vesicular stomatitis virus: Defectiveness and disease". En: Robinson, W.S. and Fox, C.F. (eds.) Mechanism of virus disease INC-UCLA symposia on molecular and cellular biology. Vol. 1. Academic Press, New York.
- Huang, A.S. and Wagner, R.R. (1966) "Comparative sedimentation coefficients of RNA extracted from plaque forming and defective particles of vesicular stomatitis virus". J. Mol. Biol. 22, 381.
- Ihara, T.; Akashi, H. and Bishop, D.H.L. (1984) "Novel coding strategy (ambisense genomic RNA) revealed by sequence analyses of Punta Toro phlebovirus S RNA". Virology 144: 246.
- Inglis, S.C. (1982) "Inhibition of host protein synthesis and degradation of cellular mRNAs during infection by influenza and Herpes simplex virus". Molec. Cell. Biol. 2, 1644.
- Inglot, A.D.; Albin, M. and Chudzio, T. (1973) "Persistent infection of mouse cells with sindbis virus: Role of virulence of strains auto-interfering particles and interferon". J. Gen. Virol. 20, 105.
- Janda, J.M.; Davis, A.R.; Nayak, D.P. and Re, B.K. (1979) "Diversity and generation of defective interfering influenza virus particles". Virology 95, 48.
- Jen, G. and Thach, R.E. (1982) "Inhibition of host translation in encephalomyocarditis virus-infected L cells: a novel mechanism". J. Virol. 43, 250.
- Johnson, K.M.; Kuns, M.L.; Mackenzie, R.B.; Webb, P.A. and Yunker, C.E. (1966) "Isolation of Machupo virus from wild rodent *Calomys callosus*". Am. J. Trop. Med. Hyg. 15, 103.
- Johnson, K.M.; Webb, P.A. and Justines, G. (1973) "Biology of Tacaribe-complex viruses", En: Lymphocytic Choriomeningitis Virus and other Arenaviruses (F. Lehman-Grube, ed.) Springer, Berlin, pp. 241.
- Johnson, K.M.; Wiebenga, U.H.; Mackenzie, R.B.; Kuns, M.L.; Tauraso, N.M.; Sholokov, A.; Webb, P.A.; Justines, G. and Beye, H.K. (1965) "Virus isolations from human cases of hemorrhagic fever in Bolivia". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 118, 113.
- Kawai, A.; Matsumoto, S. and Tanabe, K. (1975) "Characterization of rabies virus recovered from persistently infected BHK cells". Virology 67, 520.
- Kiley, M.P.; Tomori, O.; Regnery, R.L. and Johnson, K.M. (1981) "Characterization of the Arenaviruses Lassa and Mozambique"

En: Replication of Negative Strand Viruses (David H.L. Bishop and Richard W. Compans, eds.) Elsevier North Holland, Inc. pp. 11.

Kiley, M.P.; Gray, R.H. and Payne, F.E. (1974) "Replication of measles virus: Distinct species of short nucleocapsids in cytoplasmic extract of infected cells". J. Virol. 13, 721.

Kingsbury, D.W.; Portner, A. and Darlington, R.W. (1970) "Properties of incomplete Sendai virions and subgenomic RNAs". Virology 42, 857.

Laemli, U.K. (1970) "Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4". Nature 227, 680.

Lascano, E.F. and Berria, M.I. (1974) "Ultrastructure of Junin in mouse whole brain and mouse brain tissue culture". J. Virol. 14, 965.

Lehman-Grube, F. (1971) "Lymphocytic choriomeningitis virus". Virology Monographs 10, Springer-Verlag, New York.

Lehman-Grube, F.; Slenzka, W. and Tees, R. (1969) "A persistent and inapparent infection of L cells with the virus of lymphocytic choriomeningitis". J. Gen. Virol. 5, 63.

Lehman-Grube, F.; Popescu, M.; Schaefer, H. and Gachwender, H.H. (1975) "LCM virus infection of cells in vitro". Bull. WHO 52, 443.

Leung, W.C.; Leung, M.F.K.L. and Rawls, W.E. (1979) "Distinctive RNA transcriptase, polyadenylic acid polymerase and polyuridylic acid polymerase activities associated with Pichinde virus". J. Virol. 30, 98.

Leung, W.C.; Ramsingh, A. Dimock, K.; Rawls, W.E.; Petrovich, J. and Leung, M. (1981) "Pichinde virus L RNA and S RNA contain unique sequences". J. Virol. 37, 48.

Leung, W.C. and Rawls, W.E. (1977) "Virion associated ribosomes are not required for the replication of Pichinde virus". Virology 81, 174.

Loening, U.E. (1967) "The fractionation of high molecular weight ribonucleic acid by polyacrylamide gel electrophoresis". FEMS Microbiology Letters 6, 205.

Martínez-Peralta, L.; Bruns, M. and Lehman-Grube, F. (1981) "Biochemical composition of Lymphocytic choriomeningitis virus interfering particles". J. Gen. Virol. 55, 475.

Martínez-Peralta, L.; Leon, M.E.; Coto, C.E.; Laguens, R.P. (1979) "Effect of glucosamine on the replication of the arenavirus Junin in Vero cells". Intervirology 11, 188.

Martínez Segovia, Z.M. and De Mitri, M.I. (1977) "Junin virus structural proteins". J. Virol. 21, 579.

Mersich, S.E.; Leon, M.E. and Coto, C.E. (1979) "Cell nucleus participation in the multiplication of the arenavirus Tacaribe". FEMS Microbiology Letters 6, 205.

Murphy, F.A.; Buchmeier, M.J. and Rawls, W.E. (1977) "The reticuloendothelium as the target in a virus infection: Pichinde virus pathogenesis in two strains of hamsters". Lab. Invest. 37, 502.

Murray, B.K.; Biswal, N.; Bookout, J.B.; Lanford, R.E.; Courtney, R. and Melnick, J.L. (1975) "Cyclic appearance of defective interfering particles of Herpes simplex virus and the concomitant accumulation of early polypeptide VP 175". Intervirology 5, 173.

Mifune, K.; Carter, M. and Rawls, W.E. (1971) "Characterization studies of the Pichinde virus. A member of the arenavirus group". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 136, 637.

Murphy, F.A.; Webb, P.A.; Johnson, K.M. and Whitfield, S.G. (1969) "Morphological comparison of Machupo with LCM virus: Basis for new taxonomic group". J. Virol. 4, 535.

Murphy, F.A.; Webb, P.A.; Johnson, K.M.; Whitfield, S.G. and Chappell, W.A. (1970) "Arenaviruses in Vero cells. Ultrastructural studies". J. Virol. 6, 507.

Murphy, F.A. and Whitfield, S.G. (1975) "Morphology and morphogenesis of arenaviruses". Bull. WHO 52, 409.

Murphy, F.A.; Winn, W.C. Jr.; Walker, P.H.; Flemister, M.R. and Whitfield, S.G. (1976) "Early lymphoreticular viral tropism and antigen persistence: Tamiami virus infection in the cotton rat". Lab. Invest. 34, 125.

Nayak, D.P.; Tobita, K.; Janda, J.M.; Davis, A.R. and De, B.K. (1978) "Homologous interference mediated by defective interfering influenza virus derived from a temperature-sensitive mutant of influenza virus". J. Virol. 28, 375.

Nishioka, Y. and Silverstein, S. (1978) "Requirement of protein synthesis for the degradation of host mRNA in Friend eritroleukemia cells infected with Herpes simplex virus type 1". J. Virol. 27, 619.

- Nishiyama, Y. (1977) "Studies of L cells persistently infected with V.S.V.: Factors involved in regulation of persistent infection". J. Gen. Virol. 35, 265.
- Nonoyama, M. and Graham, A.F. (1970) "Appearance of defective virions in clones of reovirus". J. Virol. 6, 693.
- Ofodile, A.; Padnos, M.; Molomot, N. and Duffy, J.L. (1973) "The morphological and biological characteristics of the M-P strain of LCM virus". Infect. Immun. 7, 309.
- O'Farrell, P.H. (1975) "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins". J. Biol. Chem. 250, 4007.
- Oldstone, M.B.A.; Holmstoen, J. and Welsh, R.M. Jr. (1977) "Alterations of acetylcholine enzymes in neuroblastoma cells persistently infected with lymphocytic choriomeningitis virus". J. Cell. Physiol. 91, 459.
- Ortin, J. and Viñuela, E. (1977) "Requirement of cell nucleus for African Swine Fever Virus replication in Vero cells". J. Virology 21, 902.
- Palmer, E.L.; Obijeski, J.E.; Webb, P.A. and Johnson, K.M. (1977) "The circular segmented nucleocapsid of an arenavirus - Tacaribe virus". J. Gen. Virol. 36, 541.
- Parodi, A.J.; Greenway, D.J.; Rugiero, H.R.; Rivers, S.; Frigerio, M.; De La Barrera, J.M.; Mettler, N.; Garzón, F.; Boxaca, M.; de Guerrero, L.B. y Nota, N. (1958) "Sobre la etiología del brote epidemiológico de Junín". Día Med. 30, 2300.
- Perry, R.P.; La Torre, J.L.; Kelley, D.E. and Greenberg, J.T. (1972) "On the lability of poly(A) sequence during extraction of messenger RNA for polyribosomes". Biochem. Biophys. Acta 262, 220.
- Pedersen, I.R. (1970) "Density gradient centrifugation studies on LCM virus and on viral nuclei acid". J. Virol. 6, 414.
- Pedersen, I.R. (1973) "Different classes of ribonucleic acid isolated from LCM virus". J. Virol. 11, 416.
- Pedersen, I.R. (1979) "Structural components and replication of arenaviruses". Adv. Virus Res. 24, 277.
- Pedersen, I.R. and Konigshofer, E.R. (1976) "Characterization of ribonucleoproteins and ribosomes isolated from lymphocytic choriomeningitis virus". J. Virol. 20, 14.
- Pfau, C.J. (1974) "Biochemical and biophysical properties of the arenaviruses". Progr. Med. Virol. 18, 64.

Pinheiro, F.P.; Woodall, J.P.; Travassos da Rosa, A.P.A. and Travassos da Rosa, J.F. (1977) "Studies of arenaviruses in Brazil" *Medicina (B. Aires)* 37, 175.

Pons, M. and Hirst, G.K. (1969) "The single and double stranded RNAs and the proteins of incomplete influenza virus". *Virology* 38, 68.

Popescu, M. and Lehman-Grube, F. (1977) "Defective interfering particles in mice infected with Lymphocytic choriomeningitis virus". *Virology* 77, 78.

Popescu, M.; Schaefer, H. and Lehman-Grube, F. (1976) "Homologous interference of lymphocytic choriomeningitis virus: Detection and measurement of interference focus-forming units". *J. Virol.* 20, 1.

Portner, A. and Kingsbury, D.W. (1972) "Identification of transcriptive and replicative intermediates in Sendai virus infected cells". *Virology* 47, 711.

Preble, O.T. and Youngner, J.S. (1975) "Temperature-sensitive viruses and the etiology of chronic and inapparent infections". *J. Infect. Dis.* 131, 467.

Ramos, B.A.; Courtney, R.J. and Rawls, W.E. (1972) "The structural proteins of Pichinde virus". *J. Virol.* 10, 661.

Ramsing, A.J.; Dimock, K.; Rawls, W.E. and Leung, W.C. (1980) "Size estimation of Pichinde virus RNA by electrophoresis under denaturation condition". *Intervirology* 14, 31.

Rawls, W.E.; Banerjee, S.N.; McMillan, C.A. and Buchmeier, M.J. (1976) "Inhibition of Pichinde virus replication by actinomycin D". *J. Gen. Virol.* 33, 421.

Rawls, W.E. and Buchmeier, M.J. (1975) "Arenaviruses: Purification and physicochemical nature". *Bull. WHO* 52, 393.

Rawls, W.E. and Leung, W.C. (1979) "Arenaviruses" En: Fraenkel-Conrat, H.; Wagner, R.R. (eds.) *Comprehensive virology* Vol. 14, Plenum, New York, pp. 157.

Reich, E. and Goldberg, I.H. (1964) "Actinomycin and nucleic acid function". *Progr. Nucleic Acid Res.* 3, 183.

Riedel, B. and Brown, D.T. (1979) "Novel antiviral activity found in the media of Sindbis virus persistently infected Mosquito (*Aedes albopictus*) cell cultures". *J. Virol.* 29, 51.

- Rima, B.K.; Davidson, W.B. and Martin, S.J. (1977) "The role of defective interfering particles in persistent infection of Vero cells by Measles virus". J. Gen. Virol. 35, 89.
- Riviere, Y.; Ahmed, R.; Southern, P.J.; Buchmeier, M.J.; Dutko, F.J. and Oldstone, M.B.A. (1985) "The S RNA segment of Lymphocytic choriomeningitis virus codes for the nucleoprotein and glycoproteins 1 and 2". J. Virol. 53, 966.
- Romanowski, V. (1981) "Estructura bioquímica del virus Junín" Tesis. Universidad Nacional de La Plata, Fac. de Cs. Exactas.
- Rosas, M.F. (1984) "Bioquímica de virus. Estructura de la envoltura de virus Junín". Tesis. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas.
- Roux, L. and Holland, J.J. (1979) "Role of defective interfering particles of Sendai virus in persistent infections". Virology 93, 91.
- Rustici, S.M. (1984) "Desarrollo "in vitro" del virus Junín, proteínas intracelulares". Tesis. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas.
- Rustigian, R. (1962) "A carrier state in HeLa cells with measles virus (Edmonson strain) apparently associated with non infectious virus". Virology 66, 101.
- Saleh, F.; Gard, G.P. and Compans, R.W. (1979) "Synthesis of Tacaribe viral proteins". Virology 92, 369.
- Schmaljohn, C. and Blair, C.D. (1977) "Persistent infection of cultured mammalian cells by J.E.V.". J. Virol. 24, 580.
- Schneider, E.L.; Stanbridge, E.J. and Epstein, C.J. (1974) "Incorporation of [³H]-uridine and [³H]-uracil into RNA. A simple technique for the detection of mycoplasma contamination of culture cells. Experimental Cell Res. 84, 311.
- Simpson, R.W. and Iinuma, M. (1975) "Recovery of infectious proviral DNA from mammalian cells infected with respiratory syncytial virus". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 3230.
- Skellick, M.J. and Markus, P.I. (1978) "Persistent infection. I. Interferon inducing defective interfering particles as mediators of cell sparing: Possible role in persistent infection by vesicular stomatitis virus". Virology 85, 175.
- Skup, D. and Millward, S. (1980) "Reovirus-induced modification of cap-dependent translation in infected L cells". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 152.

- Spier, R.W.; Wood, O.; Liebhaber, H. and Buckley, S.M. (1970) "Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. IV. Electron microscopy of Vero cell cultures infected with Lassa virus". *Am. J. Trop. Hyg.* 19, 692.
- Staeneck, L.D. and Pfau, C.J. (1974) "Interfering particles from a culture persistently infected with Parana virus". *J. Gen. Virol.* 22, 437.
- Staeneck, L.D.; Trowbridge, R.S.; Welsh, R.M.; Wright, E.A. and Pfau, C.J. (1972) "Arenaviruses. Cellular responses to long term in vitro infection with Paraná and LCM". *Infect. Immun.* 6, 444.
- Stanwick, T.L. and Kirk, B.F. (1971) "Effect of actinomycin D on the yield of Lymphocytic choriomeningitis virus in baby hamster kidney cells". *Infect. Immun.* 4, 511.
- Stephenson, J.R. and Dimock, N.J. (1975) "Early events in influenza virus multiplication. I. Location and fate of the input RNA". *Virology* 65, 77.
- Stoker, M.G.P. and Mac Pherson, I.A. (1961) "Studies on transformation of hamster cells by polyoma virus in vitro". *Virology* 14, 631.
- Trapido, H. and Sanmartin, C. (1971) "Pichinde virus: a new virus of the Tacaribe group from Colombia". *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20, 631.
- Traub, E. and Kesting, F. (1963) "Experiments in heterologous and homologous interference in LCM infected cultures of murine lymph node cells". *Arch. Gesamte Virusforsch* 14, 55.
- Vezza, A.C. and Bishop, D.H.L. (1977) "Recombination between temperature sensitive mutants of the arenavirus Pichinde". *J. Virol.* 24, 712.
- Vezza, A.C.; Cash, P.; Jahrling, P.; Eddy, G. and Bishop, D.H.L. (1980) "Arenavirus recombination: The formation of recombinants between prototype Pichinde and Pichinde Munchique virus and evidence that arenavirus S RNA codes for N polypeptide". *Virology* 106, 250.
- Vezza, A.C.; Clewley, J.P.; Gard, G.P.; Abraham, N.E.; Compans, R.W. and Bishop, D.H.L. (1978) "The virion RNA species of the arenaviruses Pichindé, Tacaribe and Tamiani". *J. Virol.* 26, 485.
- Vezza, A.C.; Gard, G.P.; Compans, R.W. and Bishop, D.H.L. (1977) "Structural components of the arenavirus Pichindé". *J. Virol.* 23, 776.

Van der Zeijst, B.A.M.; Noyes, B.E.; Mirault, M.E.; Parker, B.; Osterhaus, A.D.M.E.; Swyryd, E.A.; Bleumink, N.; Horzinek, M.C. and Stark, G.R. (1983) "Persistent infection of some standard cell lines by Lymphocytic choriomeningitis virus: Transmission of infection by an intracellular agent". J. Virol. 48, 249.

Von Magnus, P. (1951) "Propagation of the PR-8 strain of influenza A virus in chick embryos. III. Properties of the incomplete virus produced in serial passages of undiluted virus". Acta Pathol. Microbiol. Scand. 29, 157.

Walker, D.L. (1964) "The viral carrier state in animal cell cultures". Prog. Med. Virol. 6, 111.

Webb, P.A.; Johnson, K.M.; Mackenzie, R.B. and Kuns, M.L. (1969) "Some characteristics of Machupo virus, causative agent of Bolivian hemorrhagic fever". Amer. J. Trop. Med. Hyg. 16, 531.

Welsh, R.M. Jr. and Buchmeier, M.J. (1979) "Protein analysis of defective interfering Lymphocytic choriomeningitis virus and persistently infected cells. Virology 96, 503.

Welsh, R.M.; Burner, P.A.; Holland, J.J.; Oldstone, M.B.A.; Thompson, H.A. and Villarreal, L.P. (1975) "A comparison of biochemical and biological properties of standard and defective Lymphocytic choriomeningitis viruses". Bull. WHO 52, 403.

Welsh, R.M.; O'Connell, C.M. and Pfau, C.J. (1972) "Properties of defective Lymphocytic choriomeningitis virus". J. Gen. Virol. 17, 355.

Welsh, R.M. and Oldstone, M.B.A. (1977) "Inhibition of immunologic injury of cultured cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus: Role of defective interfering virus in regulating viral antigen expression". J. Exp. Med. 145, 1449.

Welsh, R.M. and Pfau, C.J. (1972) "Determinants of Lymphocytic choriomeningitis interference" J. Gen. Virol. 14, 177.

Weissenbacher, M.C.; Coto, C.E. and Calelo, M.A. (1975/76) "Cross-protection between Tacaribe complex viruses. Presence of neutralizing antibodies against Junin virus (Argentine Hemorrhagic Fever) in guinea pigs infected with Tacaribe virus". Intervirology 6, 42.

Wulff, H.; Lange, J.V. and Webb, P.A. (1978) "Interrelationships among arenaviruses measured by indirect immunofluorescence". Intervirology 9, 344.

Yasumura, Y. and Kawatoka, Y. (1963) "Studies on SV40 virus in tissue culture cells". Nippon Rinsho 21, 1201.

Young, P.R.; Chanas, A.C. and Howard, C.R. (1981) "Analysis of the structure and function of Pichindé virus polypeptides". En: Negative Strand Virus (David H.L. Bishop and Richard W. Compans, eds.) Elsevier North Holland, Inc., pp. 11.

Zhdanov, V.M. and Parfanovich, M.I. (1974) "Integration of measles virus nucleic acid into the cell genome". Arch. Gesamte Virusforsch. 45, 225.